



**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Contribución al estudio de la fauna de *Culicoides* (Díptera:  
Ceratopogonidae) en la zona norte del Ecuador**

**Moisés Rubén Gualapuro Gualapuro**

**Sonia Zapata, Ph.D., Directora de Tesis**

Tesis de grado presentada como requisito  
para la obtención del título de Licenciado en Biotecnología

Quito, mayo de 2013

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**  
**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**Contribución al estudio de la fauna de *Culicoides* (Díptera:  
Ceratopogonidae) en la zona norte del Ecuador**

**Moisés Rubén Gualapuro Gualapuro**

Sonia Zapata Mena, Ph.D.  
Directora del Tesis

-----

María de Lourdes Torres, Ph.D.  
Miembro del Comité

-----

Renato León, Ph.D.  
Miembro del Comité

-----

Stella de la Torre, Ph.D.  
Decana del Colegio de Ciencias  
Biológicas y Ambientales

-----

Quito, mayo de 2013

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

-----  
Nombre: Moisés Rubén Gualapuro Gualapuro

C. I.: 100312428-4

Fecha: 22/05/2013

**DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mis padres

mis hermanos y hermana

a mi hijo Willka y a mi esposa

por todo su apoyo incondicional y enseñanzas

## AGRADECIMIENTOS

Mi especial agradecimiento a Sonia Zapata, María de Lourdes Torres, Renato León, Gabriel Trueba y Lorena Mejía por su guía y apoyo en la realización de este proyecto.

A María Celestina y Luis Juan por darme la vida, por su amor ilimitado, por ser mis mentores de vida y por su esfuerzo incansable.

A mis hermanos y hermana por compartir todos los momentos, las experiencias, las dificultades y sobre todo la alegría y deseo de vivir para aprender.

A Mery y a mi hijo Willka por ser mi auténtica felicidad y la motivación de mi vida.

A mis amigos y compañeros quienes han sido mi respaldo en todo momento.

A CORCIMA –Maquipurashun por su labor en beneficio de los niños y jóvenes de las comunidades y su incidencia para el acceso a una educación de calidad.

A todos quienes anónimamente me han apoyado para que culmine este primer peldaño de mi formación académica.

## Resumen

El género *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) comprende alrededor de 266 especies en la región Neotropical, éstas se clasifican en 15 subgéneros, 13 grupos de especies y 1 grupo de especies sin clasificación. Algunas especies tienen interés médico y veterinario, como los vectores del virus de la fiebre de Oropuche y el virus de la Fiebre Catarral Ovina o Lengua Azul entre las más importantes. Entre julio de 2010 y septiembre de 2012 se realizaron colectas entomológicas en dos localidades de la Amazonía, una localidad en la estribación de la Cordillera Occidental y una localidad Altoandina Occidental. Un total de 36 especies de *Culicoides* pertenecientes a 5 subgéneros y 9 grupos de especies fueron identificadas; de las cuales 16 especies constituyen nuevos registros para el país. Adicionalmente, se identificaron dos especies implicadas en la transmisión de enfermedades en el Neotrópico: *C. insignis* y *C. paraensis*. El análisis molecular de las regiones C1-D2 del ADNr 28S de 22 especies separa a los subgéneros *Hoffmania* y *Anilomyia*. En cuanto al grupo de especies *fluviialis* los datos moleculares sugieren que las características morfológicas podrían ser resultado de una evolución paralela. Los resultados de este estudio sugieren que la clasificación actual del género *Culicoides* basada en caracteres morfológicos merece una revisión.

### Abstract

Biting midges of the genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) comprise about 266 species from the Neotropics. These species are grouped into 15 subgenera, 13 species groups and 1 unresolved species group. Some of these species have public health and veterinary importance, as they are vectors of Oropuche Fever Virus in humans and Bluetongue Virus in ruminants. Entomological collections were carried out from July 2010 to September 2012 in two sites of the Amazon Basin, one site of Western Foothills of the Andes and one site of Western Highlands of the Andes. A total of 36 species of *Culicoides* belonged to 5 subgenera and 9 species group were identified; 16 of them were new records for the country. Additionally, two species incriminated as diseases vectors in the Neotropics were recognized: *C. insignis* vector of Bluetongue Virus and *C. paraensis* vector of Oropuche Fever Virus. Molecular analysis of C1-D2 regions of the 28S rDNA from 22 species corroborated the morphological classification in *Hoffmania* and *Anilomyia* subgenera; the molecular data for *fluviialis* species group suggested that morphological patterns might be consequence of parallel evolution. The results of this study suggested that the morphological method of classifying the genus *Culicoides* needs to be evaluated.



## TABLA DE CONTENIDOS

1.	Introducción.....	13
1.1	Generalidades del género <i>Culicoides</i> (Díptera: Ceratogonidae).....	13
1.2	Ciclo de vida .....	14
1.3	Hábitos alimenticios .....	16
1.4	Importancia médica y veterinaria.....	17
1.4.1	Virus de la Lengua Azul (VLA).....	18
1.4.2	Virus de la Fiebre de Oropouche (OROV).....	20
1.4.3	Dermatozoonosis. ....	21
1.5	Clasificación taxonómica del género <i>Culicoides</i> .....	21
1.5.1	Características morfológicas de los <i>Culicoides</i> y su uso para la identificación. 22	
1.5.1.1	Cabeza.....	22
1.5.1.2	Tórax.....	25
1.5.1.3	Abdomen.....	27
1.6	Sistemática molecular de <i>Culicoides</i> .....	28
1.7	<i>Culicoides</i> en Ecuador .....	29
2.	Justificación.....	29
3.	Objetivos.....	30
3.1.	Objetivo General.....	30
3.2.	Objetivos Específicos .....	30
4.	Área de estudio .....	31
5.	Materiales .....	31
5.1.	Colección y separación de especímenes .....	31
5.2.	Identificación de especímenes, .....	32
5.3.	Extracción de ADN.....	32
5.4.	Amplificación de ADN.....	33
5.5.	Secuenciamiento .....	33
5.6.	Análisis filogenético .....	33
6.	Métodos .....	33
6.1.	Colección de especímenes .....	33
6.2.	Separación de muestras.....	34

6.3.	Montaje de muestras .....	34
6.4.	Identificación de especies .....	35
6.5.	Análisis Molecular .....	35
6.5.1.	Extracción de ADN .....	35
6.5.2.	Amplificación de ADN.....	36
6.5.3.	Secuenciamiento .....	37
7.	Resultados.....	37
7.1.	Colección entomológica .....	37
7.2.	Análisis molecular .....	38
8.	Discusión .....	39
9.	Conclusiones.....	43
10.	Recomendaciones .....	44
11.	Referencias .....	45
12.	Tablas .....	52
13.	Figuras .....	60
14.	Anexos .....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> -Tabla de reporte del VLA a la OIE, datos del 2005 al 2012.....	52
<b>Tabla 2.</b> -Clasificación taxonómica completa del género <i>Culicoides</i> .....	53
<b>Tabla 3.</b> - Subgéneros y Grupos de especie de <i>Culicoides</i> Neotropicales.....	54
<b>Tabla 4.</b> - Especies de <i>Culicoides</i> registradas en Ecuador y su distribución en el Neotrópico. ....	55
<b>Tabla 5.</b> - Ubicación geográfica de sitios de colección de <i>Culicoides</i> . ....	58
<b>Tabla 6.</b> - Especímenes colectados e identificados por sitio. Clasificación en hembras (♀) y machos (♂) .....	58
<b>Tabla 7.</b> - Distribución de especies identificadas en el presente estudio.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> - Ciclo de vida de <i>Culicoides</i> . ....	60
<b>Figura 2.</b> - Morfología de <i>Culicoides yukonensis</i> (hembra). Tomada y adaptada de McAlpine <i>et al.</i> , 1981.....	61
<b>Figura 3.</b> - Morfología de la cabeza de <i>Culicoides</i> .....	62
<b>Figura 4.</b> - Ilustración de tipos de sensila presentes en los segmentos de antena.....	62
<b>Figura 5.</b> - Estructura del ala. <i>C. lyrinotatus</i> . ....	63
<b>Figura 6.</b> - Ilustración esquemática de las regiones conservadas (CX) y divergentes (DX) del ADN ribosomal de eucariotes.....	63
<b>Figura 7.</b> - Sitios de colección. 1 Urkusiki, 2 Pacto, 3 Comunidad Cofán-Dureno, 4 Estación de Biodiversidad Tiputini. ....	64
<b>Figura 8.</b> - Electroforesis de agarosa 1.5% y Bromuro de etidio 0.1% de la amplificación de Actina.....	65

**Figura 9.-** Electroforesis de agarosa 1.5% y Bromuro de etidio 0.1% de la amplificación de la región C1-D2 de la subunidad 28S del ADNr. .... 66

**Figura 10.-** Arboles obtenidos por el método de Neighbor joining (A) y Máximo de Parsimonia (B) de 22 especies de *Culicoides* y 1 especie de *Atrichopogon* como grupo externo. .... 67

## ÍNDICE DE ANEXOS

**Anexo 1.-** Clave para adultos del género *Culicoides* y algunos de sus subgéneros. Adaptado de Downes J.A & Wirth W.W., 1981, Paginas: 396-419 ..... 68

**Anexo 2.-** Reacción de PCR para C1-D2 ..... 70

**Anexo 3.-** Reacción de PCR para  $\beta$ -actina ..... 70

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Generalidades del género *Culicoides* (Díptera: Ceratopogonidae)

Los Culicoides son dípteros hematófagos diminutos de 1-3 mm de largo (Blackwell, 2008; Smolis, 2011), conocidos comúnmente como arenillas, purrujas, jejenes o polvorines (Ortiz & León, 1955; Borkent & Spinelli, 2007). Pertenecen al orden Díptera, suborden Nematóceras, familia Ceratopogonidae (Mihn, 2010).

En el Neotrópico son considerados importantes vectores de virus y parásitos: algunos orbiviruses a equinos, bovinos, ovinos y rumiantes silvestres, siendo el Virus de la Lengua Azul (VLA) el de mayor importancia (Mellor & Wittmann, 2002; Tabachnick, 2004); en el ser humano son vectores del Virus de la Fiebre de Oropuche, especialmente en la cuenca Amazónica (Borkent & Spinelli, 2007; Mihn, 2010) y de filáridos del género *Manzonella* y *Dipetalonema* (Ortiz & León, 1955; Borkent & Spinelli, 2007).

En cuanto a su morfología, tienen una cabeza pequeña con ojos compuestos grandes, un palpo maxilar dividido en cinco segmentos, órganos de succión y perforación que se encuentran en la parte bucal de las hembras, una antena con 14-15 segmentos denominados flagelómeros, el tórax dorsal (mesonoto) con patrones claro-oscuros y el cuerpo de color café o negro, con algunas excepciones de apariencia amarillenta-café/anaranjado (Blackwell, 2008; Mihn, 2010).

Están distribuidos por todo el mundo, desde las costas hasta las cimas de las grandes cadenas montañosas, con excepción de las zonas polares. En la región Neotropical se encuentran prácticamente en todas los ecosistemas, desde las zonas costeras hasta los páramos andinos; se han encontrado *Culicoides* a 3.320 m.s.n.m en los Andes Colombianos, e incluso, se ha reportado su presencia hasta los 4.200 m.s.n.m. Los

Ceratopogonidae se encuentran en todo lugar donde haya un poco de humedad y materia orgánica (Braverman, 1994; Borkent & Spinelli, 2007).

## 1.2 Ciclo de vida

Los *Culicoides* tienen una metamorfosis completa (holometábolos) y pasan por los siguientes estadios: huevo, cuatro estadios larvales, pupa y adulto. En el Neotrópico solamente en 36 de 266 especies (13,53%) se ha estudiado algún estado inmaduro (Figura 1) (Borkent & Spinelli, 2007).

Los huevos son colocados por la hembra en números de 30 a 200 por lote, en sustratos húmedos o en el agua cuando son especies completamente acuáticas. Tienen forma cilíndrica y eclosionan entre los 2 y 10 días (dependiendo de la temperatura), el periodo de larva dura entre 14-25 días y el período de pupa dura de 2 a 10 días (Braverman, 1994; Blackwell, 2008).

En sustratos no acuáticos, las larvas se mueven hacia abajo, donde viven como omnívoros/detrítívoros, permaneciendo comúnmente a pocos milímetros de la superficie del sustrato. Los sustratos de las larvas de *Culicoides* son vegetales en descomposición, hojarasca, frutas, estiércol, y pueden vivir en epífitas (bromelias), agujeros de árboles, entre hojas de banana, lodo, manglares y otros hábitats acuáticos/semi-acuáticos (Borkent & Spinelli, 2007; Sherlock & Guitton, 1964II). Las especies de interés veterinario se encuentran principalmente en lodo de potreros, excremento de animales u otra materia orgánica; a 2cm de profundidad (Blackwell, 2008). Por otro lado, las larvas de especies acuáticas tienen movimientos serpenteantes rápidos, son delgadas, generalmente de color blanquecino, a veces con manchas dorsales (Borkent & Spinelli, 2007; Blackwell, 2008). Se ha encontrado que las larvas migran en el sustrato durante el día y la noche, un ejemplo son las larvas de *C. furens*, que viven en las orillas fangosas de los manglares, se alimentan

de algas en la superficie del lodo durante la noche y los nemátodos debajo del barro durante el día (Blackwell, 2008). También pueden predear microorganismos o larvas de otros insectos; posiblemente tienen un rol de control biológico en estados inmaduros de varios insectos, pero se desconoce los detalles de esta función (Borkent & Spinelli, 2007; Blackwell, 2008).

En el Neotrópico los *Culicoides* están presentes durante todo el año lo que sugiere que pueden tener varios ciclos de vida anuales. En las zonas tropicales y subtropicales, podrían estar prescindiendo de los estadios larvales 3, 4 de diapausa, que es común en las especies de las zonas templadas y árticas (Lillie, 1985; Borkent & Spinelli, 2007), para completar su desarrollo en tan solo 14 días, con un máximo de siete generaciones al año (Blackwell, 2008). Al parecer la población adulta es más diversa en época lluviosa (Sherlock & Guitton, 1964II), pero no se conoce lo que sucede con esta diversidad en épocas secas, ya que el desarrollo depende de la temperatura, presencia de materia orgánica, humedad y pH (Borkent & Spinelli, 2007; Blackwell, 2008).

Hay condiciones ambientales que influyen en la dispersión por vuelo de los adultos y en el comportamiento hematófago. Se ha encontrado que *C. missipiensis* puede volar 3 kilómetros en 24 horas sin ayuda del viento (Blackwell, 2008). Con ayuda del viento los individuos podrían viajar distancias considerables y lo cual explicaría el apareamiento de enfermedades transmitidas por *Culicoides* en zonas no endémicas y su rápida dispersión, como ha ocurrido en los brotes del virus de la lengua azul en Europa desde la península ibérica y las islas mediterráneas hacia el interior del continente (Blackwell, 2008) y el reciente brote del virus de Schmallenberg al norte de Europa (EFSA, 2012).

En el Neotrópico, los *Culicoides* están en mayor número en la mañana hasta poco después del amanecer, al ocaso y en las horas tempranas de la noche; dependiendo de la especie

también se los encuentra a la media tarde o durante todo el día (Sherlock & Guitton, 1964; Lillie, 1985; Borkent & Spinelli, 2007; Merck, Sharp & Dohme, 2012). Durante la luna llena se ha observado que la actividad de las hembras de *C. furens* continúa toda la noche, mientras que en las otras fases lunares declina al anochecer (Lillie, 1985). *C. paraensis* y *C. furens* pueden entrar a la casa en el transcurso del día exclusivamente a alimentarse del ser humano (antropofílicos), las pantallas normales de las ventanas no representan barrera para su ingreso; no se tiene evidencia de que vivan dentro de las casas (Wirth & Blanton, 1959; Sherlock & Guitton, 1964).

### **1.3 Hábitos alimenticios**

Las hembras de algunas especies requieren alimentarse de sangre (hematófagas) para desarrollar sus huevos, sin embargo hay hembras que pueden dejar su primer lote de huevos sin necesidad de la ingesta de sangre (especies autógenas) (Borkent & Spinelli, 2007). Todas requieren de una fuente de hidratos de carbono, se ha visto que las hembras de *C. mississippiensis* se alimentan de las flores de plantas de Yaupon (*Ilex vomitoria*), *C. paraensis* de plantas de varias Bromeliaceae, cacao, caucho y banana; donde podrían estar cumpliendo un papel importante como polinizadores (Wirth & Blanton, 1959; Borkent & Spinelli, 2007).

La mayoría de los *Culicoides* muestran algún grado de preferencia por el huésped. Su sistema olfativo se basa en las antenas y palpos maxilares y es bastante sensible, que en combinación con otros sentidos sirven para localizar los huéspedes con altísima precisión (Blackwell, 2008).

Las hembras perforan la piel con sus mandíbulas y maxilas finamente dentadas, y se forma un cúmulo de sangre de la cual se alimentan. Existe una preferencia de sitios de alimentación: en las vacas debajo del vientre, en las patas y alrededores de la pezuña



(Merck-Sharp & Dohme, 2012), en los seres humanos las partes más propensas son las piernas, pies y zonas descubiertas; siendo las mujeres y niños los más afectados por las picaduras (Sherlock & Guitton, 1964II). Se estima que la cantidad de sangre ingerida por picadura es de  $4 \times 10^{-2}$  ml, mediante un proceso de diuresis que concentra rápidamente la sangre (Blackwell, 2008). En la región Neotropical 70 de las 266 especies de *Culicoides* son antropofílicas (Borkent & Spinelli, 2007).

Las siguientes especies se encuentran en un número considerable y representan un problema para las poblaciones humanas: *C. furens* y *C. phlebotomus* en las zonas costeras de Centro América y parte norte de Sudamérica; *C. maruim* en la zona costera de Brasil; *C. insinuatus*, *C. puracensis* y *C. pachymerus* en los Andes y piedemonte Colombianos; *C. pseudodiabolicus* y *C. paraensis* en la cuenca Amazónica; *C. lahillei* y *C. debilipalpis* en Paraguay y noreste de Argentina; *C. caridei* en Uruguay y la provincia de Buenos Aires-Argentina; y *C. patagoniensis* en Argentina y la Patagonia Chilena (Borkent & Spinelli, 2007; Santamaría *et al.*, 2008; Carrasquilla *et al.*, 2010).

Los machos de los *Culicoides* son similares a las hembras, pero las estructuras bucales no poseen dientes distales ni son aptas para perforar y alimentarse de sangre como en el caso de las hembras (Wirth & Blanton, 1959). Se ha visto tanto a machos como a hembras alimentándose de néctar de flores pequeñas, preferentemente de color blanco y verde (Borkent & Spinelli, 2007).

#### **1.4 Importancia médica y veterinaria**

Mihn (2010), describe que los *Culicoides* son vectores de 14 enfermedades causadas por arbovirus (8 por Orbivirus (*Reoviridae*), 1 por *Rhabdoviridae*, 5 por Bunyavirus (*Bunyaviridae*)); asimismo de 9 protozoarios y 19 filarias. De ellos cuatro virus: Changuinola (*Reoviridae*), Virus del Oeste del Nilo, Virus de Oropouche y Virus del Valle

del Rift (*Bunyaviridae*); y tres filarias: *Mansonella ozzardi*, *Mansonella perstans* y *Mansonella streptocerca*, causan afecciones al hombre; los otros virus, todos los protozoarios y las filarias afectan a los animales. Los datos refieren mayor afección a los animales domésticos como: ovinos, bovinos, otros rumiantes, aves de corral y algunas especies silvestres (Borkent & Spinelli, 2007; Minh, 2010). En la Región Neotropical, el Virus de la fiebre de Oropuche en el hombre y el Virus de la Lengua Azul en los animales son los de mayor importancia (Wittmann *et al.*, 2002; Borkent & Spinelli, 2007). El parasitismo por filáridos de los Géneros *Mansonella* y *Dipetalonema* se da en focos endémicos (Ortiz & León 1955; Borkent & Spinelli, 2007). En los caballos, la picadura de los Culicoides les causa hipersensibilidad mediada por una respuesta del IgE a las proteínas de la glándula salivar de estos insectos Hellberg *et al.*,(2006).

#### 1.4.1 Virus de la Lengua Azul (VLA).

La fiebre catarral ovina o conocida también como **lengua azul** es una enfermedad, no contagiosa, transmitida por insectos hematófagos del género *Culicoides* que afecta a rumiantes domésticos y silvestres (Tomich *et al.*, 2009; Bobbi, 2010). Se produce principalmente en zonas tropicales y subtropicales y su distribución está relacionada con la presencia de los factores relacionados al vector y el clima. El virus de la lengua azul se distribuye entre las latitudes 40°N y 35°S, en once de los trece países de Sudamérica (Tomich *et al.*, 2009). Actualmente, cuenta con 25 serotipos identificados en varios países del mundo, los serotipos presentes en el Neotrópico son: 1, 3, 6, 8, 12, 14, y 17, los cuales son transmitidos por *C. insignis* (Tanya *et al.*, 1992; Mellor & Wittmann, 2002; Tabachnick, 2004) y *C. pusillus* (Perruolo, 2009); otros como *C.furens*, *C. filarifer* y *C. trilineatus* son considerados posibles vectores menores (EFSA, 2007).

La enfermedad de la Lengua Azul se encuentra en la lista A de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE siglas en inglés). Las enfermedades de la lista A son aquellas con potencial de transmisión muy seria y de rápida expansión, tienen consecuencias graves en la salud pública; así como en lo socioeconómico al afectar el comercio internacional de animales y productos de origen animal (USDA-APHIS-VS, 1998).

En la base de datos de la OIE desde el 2005 hasta el segundo semestre del 2012, la enfermedad no se ha reportado en el Ecuador (Tabla 1). En el estudio realizado por Merino (2011) en la provincia de Pichincha, se encontró la presencia de anticuerpos precipitantes para el VLA (método AGID) en el suero de 16 de los 200 ovejas analizadas, estos sueros positivos fueron todos procedentes de las zonas bajas, indicando que la altitud influye en la distribución de los vectores y la probabilidad de transmisión del VLA, en esta investigación se reportan también otros estudios realizados por el Dr. Mantilla en Esmeraldas, Manabí, Los Ríos, El Oro, Guayas donde encontraron anticuerpos para VLA en bovinos y caprinos.

La enfermedad tiene una mortalidad alta en algunas razas de ovinos, caprinos y algunos cérvidos; raramente se presenta en bovinos y en la mayoría de los otros rumiantes silvestres (Lager, 2004; Tomich *et al.*, 2009). La importancia económica para el ganado ovino radica no sólo en las pérdidas directas ocasionadas por la muerte de los animales, sino también en la pérdida de condición corporal, el retraso en el envío a matadero o la disminución del rendimiento canal, la degradación de la lana o el retraso en el crecimiento del animal, así como los fallos reproductivos, los abortos o el nacimiento de corderos débiles o malformados (Merino C., 2011; Erasmus, 1975 citado en Pérez, 2012). Las principales causas de pérdidas económicas en la producción de ganado bovino se deben a efectos indirectos como el aborto, reducción de desempeño reproductivo, reducción de la

cantidad leche, pérdida de peso, la restricción internacional para el movimiento animal y sus germoplasmas (Tomich R.G. *et al.* 2009). La enfermedad de la lengua azul puede terminar en una metritis, enfermedad de los bovinos que se caracteriza por la presencia de exudado purulento en el útero (Cruz Barraqueta, 2009). Las pérdidas por la metritis se calculan en US\$ 285 por cada ciclo de lactancia, debido al alargamiento del intervalo entre partos, aumento de la tasa de eliminación, medicamentos aplicados y leche desechada (Kasimanickam *et al.*, 2004).

#### **1.4.2 Virus de la Fiebre de Oropouche (OROV).**

La **fiebre de Oropouche** es causada por el virus del mismo nombre que es miembro de la familia *Bunyaviridae*, género *Orthobunyavirus*, serogrupo *Simbu* que incluye 20 serotipos, de los cuales 4 se encuentran en Sudamérica (Forattini, 2002; PAHO, 2010). Fue aislado por primera vez en 1955 en Trinidad y Tobago. En los últimos 48 años se han registrado más de medio millón de casos, convirtiéndose en un serio problema de salud pública (Baisley *et al.*, 1998; Bernardes *et al.*, 2009)

Se han registrado brotes en zonas urbanas de Brasil, Perú, Panamá y Trinidad y Tobago (Bernardes *et al.*, 1988; Manock *et al.*, 2009; PAHO, 2010). Las personas son más proclives de adquirir la fiebre de Oropouche, en épocas lluviosas cuando abundan los *Culicoides* (Sherlock & Guitton, 1964II). En el Neotrópico *C. paraensis* está implicado en su transmisión (Borkent & Spinelli, 2007; Mihn, 2010). En el Ecuador se encontró la presencia de IgM para OROV en el suero de 1 de 304 pacientes de la provincia de Pastaza que presentaban cuadros de fiebre de 38°C por 7 días y estaban acompañados de al menos uno de los siguientes síntomas: dolor de cabeza, mialgia, dolor ocular, dolor abdominal, artralgia, fatiga generalizada, tos, náuseas o vómitos, dolor de garganta, rinorrea, disnea,

diarrea, hematoquecia, ictericia, mareos, desorientación, rigidez en el cuello, erupción cutánea, equimosis, epistaxis o hemorragia gingival (Manock *et al.*, 2009).

### 1.4.3 Dermatozoonosis.

Los *Culicoides* son especialmente importantes debido a la molestia causada por sus picaduras, que pueden desencadenar reacciones alérgicas y otras patologías en la piel (Sherlock & Guitton, 1964II; Lilli, 1985; Borkent & Spinelli, 2007; Santamaría *et al.*, 2008). Las picaduras provocadas por los *jejenes* en las zonas costeras de Fortaleza, Brasil y las costas de Panamá afectan a las actividades turísticas, actividades diarias y al desarrollo de nuevos conjuntos habitacionales cerca de los manglares, ciénagas, humedales y estuarios (Wirth & Blanton, 1959; Sherlock & Guitton, 1964II; Borkent & Spinelli, 2007). En el piedemonte de la Cordillera Oriental Colombiano *C. pachymerus* es el agente causal de los casos de dermatozoonosis reportados en las casas de salud locales (Santamaría *et al.*, 2008; Carrasquilla *et al.*, 2010). Mientras que *C. furens* es la especie de mayor importancia en zonas costeras y humedales (Wirth & Blanton, 1959) y *C. paraensis* en las zonas urbanas de la cuenca Amazónica en épocas lluviosas (Sherlock & Guitton, 1964II). Las personas más afectadas son mujeres y niños; quienes visten prendas que dejan partes descubiertas como los brazos, manos, pies, piernas; y son ellos los que solicitan a menudo el tratamiento médico para las infecciones secundarias derivadas de las picaduras de *Culicoides* (Sherlock & Guitton, 1965IV).

## 1.5 Clasificación taxonómica del género *Culicoides*.

Pertenece al orden Díptera, suborden Nematóceras, familia Ceratopogonidae, (Borkent & Spinelli, 2007) (Tabla 2). El género *Culicoides* es el más diverso y numeroso de la familia Ceratopogonidae, se describen un total de 1366 especies alrededor del mundo: 1322 vivas y 44 extintas (Borkent, 2012); 407 especies se encuentran en el continente americano

(Minh, 2010) de las cuales 266 están distribuidas en la Región Neotropical (Borkent & Spinelli, 2007).

Las especies neotropicales se agrupan en 15 subgéneros, 13 grupos de especies no ubicados en subgéneros y un grupo de especies misceláneo sin clasificación. Los subgéneros más numerosos son *Hoffmania* y *Haematomyidium* (Borkent & Spinelli, 2007; Borkent, 2012) (Tabla 3).

### **1.5.1 Características morfológicas de los Culicoides y su uso para la identificación.**

La morfología general de los *Culicoides* está compuesta de: la cabeza, el tórax dividido en tres segmentos (protórax, mesotórax y metatórax), el abdomen, tres pares de patas que terminan en un gancho/garra, y un par de alas que salen del mesotórax (Figura 2) (Mihn Hoan T., 2010). Para la identificación de *Culicoides* en el Neotrópico, se ha utilizado taxonomía clásica basada en criterios morfológicos muy característicos de este género y algunas medidas morfométricas (Wirth, Dyce, & Spinelli, 1988; Felipe-Bauer *et al.*, 2009; Spinelli *et al.*, 2009; Augot *et al.*, 2010; Mihn, 2010), las cuales se describen a continuación.

#### **1.5.1.1 Cabeza**

**Ojos:** tienen un par de ojos compuestos bastante grandes, reniformes, que inician en la cara anterior de la cabeza, cubren las caras laterales y llegan hasta la frente; donde en algunas especies se juntan y en otras están parcial o moderadamente separados, esto es de importancia en la identificación. Las omatidias (ojos individuales que forman el ojo de los insectos) están separadas entre sí por espacios que están cubiertos con pelos finos.

**Antenas:** poseen un par de antenas moniliformes (segmentos alargados y ensamblados como una cadena). Se originan en la parte superior de la convexidad justo debajo de los ojos. Cada antena se compone de 15 segmentos, rara vez 14 en algunos machos. Los segmentos de las antenas son: el pro-escapo (segmento I) el cual es un anillo esclerotizado inserto en la cabeza, el escapo (segmento II) que es un anillo abultado y los segmentos restantes III-XV. En los machos los dos primeros segmentos son bastante abultados y ocupan toda la convexidad (Figura 3), mientras que en las hembras son poco abultados. En las hembras los segmentos III-X son cilíndricos y cortos mientras que los segmentos XI-XV son generalmente cilíndricos y alargados. En los machos los segmentos III-XII son hinchados en la base y bastante cortos, mientras los segmentos XIII-XV son largos; la antena de los machos tiene penachos pilosos por lo que tienen una apariencia más plumosa que la antena de las hembras (Felippe-Bauer, Bauer & Silva, 1989; Kline & Axtell, 1999; Minh, 2010). Los segmentos antenales poseen órganos sensoriales llamadas sensilas, su distribución y número varían entre especies.

Existen cinco tipos de sensilas: ampullacea, chaetica, basicónica, trichodea y coelocónica como se indica en la Figura 4 (Felippe-Bauer, Bauer & Silva, 1989; Kline & Axtell, 1999; Minh, 2010). Este último tipo de sensila es utilizado en la identificación taxonómica, está siempre presente en el segmento III y dependiendo de la especie en el resto de segmentos. Por ejemplo en *C. paraensis* del subgénero *Haematomyiidium* están presentes dos sensilas coelocónicas en cada uno de los segmentos III, VIII-X (Felippe-Bauer, Bauer & Silva, 1989); en *C. insignis* del subgénero *Hoffmania* están en los segmentos III, V, VII, IX, XI-XV (Wirth, Dyce & Spinelli, 1988).

Para la identificación de *Culicoides* se utilizan algunos parámetros morfométricos como el índice antenal y existe uno específico para las especies del neotrópico que se calcula de la siguiente manera:

En hembras: razón entre la sumatoria de los segmentos XI-XV y sumatoria de medidas de los segmentos III-X.

$$IA_{\text{♀}} = \frac{\sum_{i=XI}^{XV} l_n}{\sum_{i=III}^X l_n} \text{ (Ecuación 1)}$$

En machos: razón entre la sumatoria de los segmentos XIII-XV y sumatoria de medidas de

$$\text{los segmentos III-XII. } IA_{\text{♂}} = \frac{\sum_{i=XIII}^{XV} l_n}{\sum_{i=III}^{XII} l_n} \text{ (Ecuación 2)}$$

Otro parámetro es la razón antenal que tiene mayor precisión que el índice antenal y corresponde a la razón entre las longitudes del primer segmento más largo y el último segmento más corto (Minh, 2010), en las especies neotropicales no se ha encontrado referencia de su uso.

$$\text{En hembras: } RA_{\text{♀}} = \frac{l_{XI}}{l_X}, \text{ (Ecuación 3)} \quad \text{En machos: } RA_{\text{♂}} = \frac{l_{XIII}}{l_{XII}} \text{ (Ecuación 4)}$$

Asimismo se utiliza el índice probóscide – cabeza, donde, P: es la medida desde la torma hasta el extremo de la probóscide y H: es la medida desde el folículo interocular hasta la torma (H),

$$I_{P/H} = \frac{P}{H} \text{ (Ecuación 5)}$$

**Aparato bucal:** los principales órganos que lo conforman son: el clípeo que se encuentra justo debajo de la base de la inserción de las antenas y las piezas bucales de perforación. Este aparato está formado de: labrum - epifaringe, par de estiletes, la mandíbula, las



maxilas, la hipofaringe, el labio y el cibarium. Las mandíbulas y las maxilas tienen unos dientes pequeños.

**Palpo maxilar:** es una estructura de cinco segmentos (PI a PV) insertados a ambos lados del tronco de la cabeza. Los dos primeros segmentos están fusionados, el tercer artículo es generalmente abultado y tiene un órgano sensorial ó foseta de importancia taxonómica. Estas fosetas sensoriales tienen tres formas principales: tipo I de forma regular y circular con subtipos a (superficial) y b (profunda); tipo II, con subtipos a (semicircular irregular) y b (policíclica), y tipo III que presentan hoyuelos de diámetro pequeño dispersos en pequeños grupos. Con fines taxonómicos se calcula el índice palpal que corresponde a la razón entre la longitud y grosor del artículo PIII (Ecuación 5) (Minh, 2010).

$$IP = \frac{l_{III}}{a_{III}} \text{ (Ecuación 6)}$$

### 1.5.1.2 Tórax

**Patas:** son tres pares de patas alargadas y delgadas, siendo el primer par más corto; cada pata se compone de nueve artículos: enganche, trocánter, fémur, tibia y cinco artículos tarsales. El peine tibial es un conjunto de 4-6 espinos principales y setas secundarias, ubicadas en el extremo inferior de la tibia de las patas medias que junto con el patrón de pigmentación de las bandas en la tibia y fémur de cada pata son de interés taxonómico.

**Alas:** Es la estructura más importante para la taxonomía, las alas de las especies del Neotrópico; pueden medir entre 0.63-2.16 mm de largo (Wirth, Dyce & Spinelli, 1988). El par de alas membranosas salen del mesotórax y un par de alas vestigiales llamadas halterios salen del metatórax. Las alas tienen patrones geométricos y de pigmentación específicos que son de utilidad en el diagnóstico y clasificación de especies. Cada ala está

constituida por: nervaduras o venas, celdas y elementos anexos. (McAlpine, 1981; Spinelli *et al*, 2005; Borkent & Spinelli, 2007; Minh, 2010) (Figura 5).

Las nervaduras: son un conjunto de conductos huecos que forman un diseño particular por especie. Desde el borde anterior al posterior, se distinguen 7 nervaduras principales: vena costal (C), subcostal (ssC), radial (R se divide en ramal anterior  $R_{1+2}$ , ramal posterior  $R_{3+4+5}$ ), media (M se divide en ramal anterior  $M_1$ , ramal posterior  $M_2$ ), radio-medial (rm), cubital (Cu se divide en ramal anterior  $Cu_1$  y posterior  $Cu_2$ ) y anal (ramales  $An_1$  y  $An_2$ ).

Las celdas: son los espacios llanos formados por las venas y los bordes de las alas; desde lo anterior a posterior se ubican: celda subcostal (ssc), basal (b), radial (r,  $r_1$ ,  $r_2$ ), media (m,  $m_1$ ,  $m_2$ ), cubital (cu) y anal (an).

Los elementos anexos: corresponde a las microtriquias, macrotriquias y las cerdas. Las microtriquias son pequeñas extensiones pilosas de la cutícula y distribuidas por toda el ala. Las macrotriquias con estructuras pilosas más largas que las microtriquias, tienen una base alveolar en la superficie del ala, su distribución difiere según las especies y generalmente cerca del borde de las celdas  $r_3$ ,  $m_1$ ,  $m_2$  y venas radiales. Las cerdas son estructuras pilosas que están generalmente al borde del ala en la celda costal y anal.

Para la identificación se utiliza el color de halterios, patrón de pigmentación del dorso del tórax (mesonotum), la geometría del ala y patrón de pigmentación (número de máculas claras por celda, pigmentación de venas, pigmentación de bordes de venas, forma de las celdas  $r_1$  y  $r_2$ ); con las medidas se calcula el índice costal:

$$I_C = \frac{c}{a} \text{ (Ecuación 7)}$$

Donde,  $c$ : es la medida de la vena costal desde el arculus hasta el borde de la celda y  $\bar{a}$ : es la medida del ancho máximo promedio del ala.

### **1.5.1.3 Abdomen**

Está formado por once segmentos, cuyo último segmento forma un cerco en las hembras y el hipopigium en los machos. La parte dorsal del abdomen es generalmente más oscura que la ventral. La morfología externa e interna es de importancia en la identificación de las especies.

**Espermateca** (hembras): son ovarios fusiformes en números de 1 a 4 de los cuales 1 a 3 son funcionales y uno es vestigial (no funcional), se conectan a través de oviductos que se fusionan y en la parte final tienen un anillo esclerotizado de formas y dimensiones diferentes que son útiles en la identificación de especies. Son de interés taxonómico el número, forma y tamaño (largo y ancho) de las espermatecas; presencia o ausencia del conducto esclerotizado que conecta a las espermatecas a los oviductos; forma y tamaño (largo y ancho) del anillo esclerotizado y la espermateca vestigial; grosor y magnitud de separación de las placas esclerotizadas en el octavo segmento

**Hipopigium** (machos): en los machos la apariencia genital externa es única y lo más importante en la identificación de las especies macho. Las estructuras que lo componen son: pene o aedeagus, parámero, cercus, esterno, tergo, lamella, estilo, coxito, apodema. El noveno segmento tiene la forma de un anillo irregular esclerotizado compuesto del tergo fusionado al esternón. El noveno tergo tiene la forma de un lóbulo expandido o placa, está flanqueada por un par de lóbulos membranosos llamados cercus en la cara ventromesal. El aedeagus es generalmente una estructura en forma de Y con el vástago dirigido ventrocaudalmente, formando el soporte esclerotizado en la superficie ventral del conducto genital masculino; la porción distal es menos esclerotizado que los brazos basales y en

forma de U. Los parámetros son un par de escleritos internos esclerotizadas en forma de barra, en algunos grupos de especies los parámetros pueden estar fusionados y parecer un plato mesal. Para taxonomía se observa la forma, tamaño y coloración del aedeagus, tamaño, grosor del cercus y de los parámetros.

### **1.6 Sistemática molecular de Dípteros**

El ADN ribosomal (ADNr) se utiliza en estudios filogenéticos al tener regiones con distintas tasas de mutación que dependiendo del nivel taxonómico que se requiere analizar puede usarse diferencialmente. Éstas regiones pueden ser de mutación rápida (divergentes D) y altamente conservadas (C) (Figura 6); siendo las regiones con 70-100% de similitud en la secuencia, las óptimas para estudios filogenéticos (Hillis & Dixon, 1991; Calvo de Pablo, 2009). Las secuencias de las subunidades 18S y 28S del ADNr que han evolucionado más rápidamente pueden utilizarse para comparar especies que se espera sean más próximas, mientras que las regiones que han evolucionado más lentamente pueden emplearse para aquellas especies más distantes (Calvo de Pablo, 2009; Cameron *et al.*, 2007; Chen, Tsai, & Tzeng, 2009; Wiegmann *et al.*, 2011). Los genes del 28S permiten la valoración de los tiempos de surgimiento de los taxones (Yeates *et al.*, 2007) y el estudio de la filogenia del orden díptera a nivel de familias (; Pawlowski *et al.*, 1996; Wiegmann *et al.*, 2011), géneros (Mengual, Stahls & Rojo, 2007) y especies (Phayahasena *et al.*, 2010).

La diversidad del orden Díptera ha sido ampliamente estudiada. Para estimar las relaciones filogenéticas se realizó un análisis múltiple de 371 caracteres morfológicos e información molecular de 12 genes para 149 de 157 familias (Wiegmann *et al.*, 2011). En cuanto al género *Culicoides*, el tamaño diminuto y la gran diversidad de especies dificulta la correcta identificación. Para corregir esta limitante se realiza una combinación de la identificación morfológica y molecular (Perrin *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2009; Augot *et al.*, 2010).

Para el estudio molecular de los Culicoides se han utilizado diferentes marcadores tales como: secuencias del primer espacio interno transcrito (ITS-1) del ADNr (Perrin *et al.*, 2006), segundo espacio interno transcrito (ITS-2) del ADNr (Gomulski *et al.*, 2005; Gomulski L. *et al.*, 2006); gen de la Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) del ADN mitocondrial (Balczun *et al.*, 2009; Augot *et al.*, 2010); combinación de ITS-1, ITS-2 y 18S (Kiehl *et al.*, 2009); análisis de locis de enzimas (Pili *et al.*, 2010); Los marcadores moleculares deben ser usados para probar y dar soporte al trabajo de la taxonomía tradicional, pero no remplazarla; una adecuada combinación permitirá un mejor entendimiento de las especies y de los patrones de transmisión de patógenos por este género (Matsumoto *et al.*, 2009; Garros *et al.*, 2010).

### **1.7 *Culicoides* en Ecuador**

De acuerdo con las revisiones realizadas por: Mihn (2010) en Ecuador están presentes 37 especies; por su parte Spinelli y colaboradores (2009) encontraron 35 especies; y, Ortiz & León (1955) describieron 18 especies; agrupando la información de estos tres estudios en Ecuador habrían 49 especies presentes (Tabla 4).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

A pesar de su importancia como vectores de enfermedades que afectan a los seres humanos y animales, existen muy pocos estudios del género *Culicoides* en Ecuador y la región Neotropical. En nuestro país se reporta solamente 49 especies, cifra que podría subestimar el número real de especies presentes al comparar con las 114 especies registradas en Colombia (Spinelli *et al.*, 2009) o 148 especies en Costa Rica (Spinelli & Borkent, 2004); Borkent & Spinelli (2007) mencionan que la región andina y la Amazonía son zonas poco estudiadas y con potencial de contener muchas especies desconocidas. Además, se

desconoce el rol biológico y epidemiológico de los *Culicoides* de tal manera que un estudio de la distribución de especies de *Culicoides* en Ecuador resulta imperante.

Los brotes de Fiebre Catarral Ovina en Europa y países como Brasil y Argentina causan graves pérdidas económicas en los criadores de ovinos. Por otro lado, los brotes endémicos cada vez más frecuentes de la Fiebre de Oropouche en la cuenca Amazónica de países vecinos; más la falta de estudios recientes de la fauna de *Culicoides* en el Ecuador, no permite conocer la presencia de posibles especies vectoras y de interés para la salud pública y animal de nuestro país.

Los resultados de este estudio servirán como referencia para realizar investigaciones posteriores y complementarias en la identificación de especies de *Culicoides* en el Ecuador y son base para estudios de sistemática molecular de especies del Neotrópico.

Finalmente, la identificación de especies potenciales vectores de enfermedades de importancia médica y veterinaria permitirá establecer zonas potenciales de riesgo para brotes epidémicos y el desarrollo de programas de control y planificación para evitar los mismos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General**

Estudiar la distribución de especies del género *Culicoides* (Díptera: Ceratopogonidae) en cuatro localidades la zona norte del Ecuador.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

Identificar las especies de *Culicoides* a través del uso de claves de identificación morfológicas.

Realizar un estudio piloto de la sistemática molecular del género *Culicoides* a través del análisis de la región C1-D2 del ADN ribosomal 28S.

Registrar la fauna de *Culicoides* presente en las provincias de Imbabura, Pichincha, Sucumbíos y Orellana.

Determinar la presencia de especies de interés médico y veterinario en las zonas de estudio.

#### **4. ÁREA DE ESTUDIO**

Las muestras fueron colectadas en: el bosque de transición y páramo de la Cordillera Occidental, localidad Urkusiki (Otavalo, Imbabura) en Septiembre del 2012; en el piedemonte de la Cordillera Occidental, localidad Pacto (Pichincha) en Marzo del 2011, En la Amazonía Ecuatoriana: localidad Cofán - Dureno (Sucumbíos) en Julio del 2011 y al borde norte del Parque Nacional Yasuní, zona de la Estación de Biodiversidad Tiputini-USFQ en Julio del 2010 (Orellana) (Tabla 5, Figura 7). El trabajo posterior a la colección fue realizado en la Universidad San Francisco de Quito, la parte entomológica en el Laboratorio de Entomología y Medicina Tropical y la parte molecular en el Laboratorio de Microbiología.

#### **5. MATERIALES**

##### **5.1. Colección y separación de especímenes**

- Trampas tipo CDC (Centers for Disease Control) de luz blanca
- Baterías 6V (FAMMA MR12-6)
- Recargador de baterías (VMARK)
- Mallas entomológicas

- Frascos de colección
- Etanol al 70%

## **5.2. Identificación de especímenes,**

- Portaobjetos y Cubreobjetos
- Pinzas entomológicas
- Pipetas desechables
- Jeringas de 1ml y agujas (NIPRO 30G\*1/2)
- Mechero Bunsen
- Alcohol al 70%
- Solución Marc André (hidrato de cloral 40%, y ácido acético 30%)
- Goma cloral (Hidrato de Cloral 30%, Goma Arábica 20% y Glicerina 13%)
- Microscopio de luz (LEICA EZ4, Wetzlar, Alemania)

## **5.3. Extracción de ADN**

- CTAB (CTAB 2% p/v, NaCl 1.4M, EDTA 20Mm pH 8, HCl 100Mm pH 8),
- Proteinasa K (Invitrogen)
- Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1)
- Acetato de Sodio 3M pH 5
- Etanol al 100%, etanol al 70%,
- Buffer TE (10mM Tris-HCl, pH 8, 0.1mM EDTA)
- Microcentrifugadora Eppendorf ®
- Vortex
- Baño María Shel LAB ®



#### 5.4. Amplificación de ADN

- H<sub>2</sub>O para PCR
- Buffer 5X
- MgCl<sub>2</sub> 25mM
- dNTPs 2mM
- Primers C1' (50uM): 5'-ACCCGCTGAATTTAAGCAT-3'
- Primer D2 (50uM): 5'-TCCGTGTTTCAAGACGGG-3'
- Taq Polimerasa (GoTaq ®)
- Muestras de DNA de *Culicoides*
- Termociclador Bio-RAD T100™.

#### 5.5. Secuenciamiento

- Amplicones C1-D2

#### 5.6. Análisis filogenético

- Software: PRE GAP, GAP, MEGA

## 6. MÉTODOS

### 6.1. Colección de especímenes

Los especímenes fueron colectados en horas de la tarde y noche con trampas tipo CDC de luz clara. Posteriormente fueron transferidos a envases con alcohol al 70% y transportados al laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical de la USFQ.

## **6.2. Separación de muestras**

La separación de los especímenes pertenecientes al género *Culicoides* se realizó con la ayuda de un estéreo microscopio (LEICA EZ4, Wetzlar, Alemania) en base a las características morfológicas descritas por Borkent & Spinelli (2007) y Mihn (2010).

## **6.3. Montaje en placa**

Cada espécimen se colocó sobre una lámina portaobjetos y se adicionó 2-3 gotas de alcohol al 70% para evitar la desecación del insecto. Con un par de agujas estériles, en un microscopio binocular de luz (LEICA EZ4, Wetzlar, Alemania) se separaron las alas, la cabeza y los últimos segmentos (8-11) del abdomen. En el mismo portaobjetos, se adicionó 1-2 gotas de solución Marc André (Hidrato de cloral 40%, y ácido acético 30%) sobre la cabeza y los segmentos del abdomen. Las alas se mantuvieron en alcohol puesto que no debían aclararse. El tórax, parte del abdomen y patas se guardó con la ayuda de agujas estériles en un microtubo de 1.5 ml a -20°C para la extracción de ADN.

Se calentó ligeramente la placa con la solución Marc André por unos 10 segundos evitando el contacto directo con el fuego y que se evapore por completo la solución. En una esquina de la lámina portaobjetos se colocó dos gotas de goma cloral (Hidrato de Cloral 30%, Goma Arábiga 20% y Glicerina 13%), y se sumergió en ella las estructuras aclaradas. Se colocó la cabeza con las partes bucales y las antenas hacia el observador, las alas paralelas y el abdomen con la parte ventral hacia el observador, luego se puso una lámina cubre objetos evitando el ingreso de burbujas de aire, finalmente se presionó ligeramente para que las estructuras queden en las posiciones adecuadas (Augot *et al.*, 2010).

#### **6.4. Identificación de especies**

La identificación se realizó con claves fotográficas facilitadas por Jean Claude Decolle (Francia), el Atlas de fotografías de las alas de Wirth, Dyce & Spinelli (1988) y bibliografía actualizada.

Las medidas se realizaron con la regleta integrada al microscopio binocular (LEICA DME, Wetzlar, Alemania), previamente calibrada con el patrón que viene en el mismo kit de medición. Luego estas medidas fueron transformadas a sus medidas reales; en milímetros las medidas de las alas y a micrómetros el resto de medidas en Microsoft Excel 2007™. Los índices se calcularon en una hoja electrónica de Microsoft Excel™ con las indicaciones dadas por Wirth, Dyce & Spinelli (1988) y Borkent & Spinelli (2007). La separación por subgéneros o grupos de especies se realizó en base a la clave para adultos del género *Culicoides* Vargas (1960). Un ejemplo las especies del género *Hoffmania*, *Anilomyia* y *Culicoides* tienen la celda r2 en una mácula clara, el resto lo tienen pigmentada la celda r2.

La identificación de cada espécimen fue confirmada y revisada por los especialistas de *Culicoides*: Dr. Jean Claude Decollé de la Universidad de Estrasburgo y el Dr. Denis Augot de la Universidad de Reims en Francia.

#### **6.5. Análisis Molecular**

##### **6.5.1. Extracción de ADN**

Se trituró el tórax, abdomen y patas del insecto con ayuda de un pistilo estéril en un microtubo de 1.5 ml con 700 µl de CTAB (CTAB 2% p/v, NaCl 1.4M, EDTA 20Mm pH 8, HCl 100Mm pH 8), luego se adicionó 20 µl de proteinasa K. Se homogenizó en un vórtex y se incubó por 2 horas a 65°C, agitando las muestras cada 15 minutos para facilitar

la ruptura de membranas celulares. Terminada la incubación se dejó enfriar las muestras a temperatura ambiente y se agregó 700 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló invirtiendo vigorosamente hasta formar una emulsión que después se centrifugó por 5 minutos a 12000 rpm. Se transfirió 500 µl de la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 ml rotulado (sin tocar la interfase para evitar contaminar con proteínas celulares la muestra). Se agregó 50 µl de Acetato de Sodio 3M pH 5, y 1000 µl de etanol 100% a temperatura de hielo. Se mezcló por inversión y se dejó a -20°C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 13200 rpm por 11 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1000µl de Etanol 70%. Se descartó el sobrenadante y se dejó el tubo invertido dentro de la incubadora a 37 °C por 10 a 15 minutos. Al final se resuspendió la muestra en 50 µl de buffer TE (10mM Tris-HCl, pH 8, 0.1mM EDTA) y fue conservada a -20°C.

Para realizar la cuantificación de ADN, se siguieron las instrucciones de GE Nanovue Spectrophotometer (General Electric, UK). Todas las muestras fueron diluidas a una concentración final de 20ng/µl.

### **6.5.2. Amplificación de ADN**

Se amplificó la región C1, D1, C2 y D2 del ADN ribosomal 28S (Figura 6) que tiene un tamaño de 750 pares de bases (pb). El volumen final de cada reacción se ajustó a 50 µl, se utilizó 5 µl de ADN y 50 pmol de los primer C1' (5'-ACCCGCTGAATTTAAGCAT-3') y D2 (5'-TCCGTGTTTCAAGACGGG-3') (Smolix, 2012). Las condiciones de amplificación fueron: denaturación inicial de a 94 °C por 3 min; seguido de 40 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 s, anidamiento a 58 °C por 90 s, y extensión a 68 °C por 60 s; y una extensión final a 72 °C por 10 minutos; usando Taq polimerasa (Anexo 2). 5 µl de los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en 1.5% de gel de agarosa con

Bromuro de Etidio. El resto de los productos de PCR se guardaron a -4°C para enviarlos a secuenciar.

Adicionalmente, se realizó una PCR de Actina 120 bp (Anexo 3) para confirmar la ausencia de elementos inhibidores de la reacción.

### **6.5.3. Secuenciamiento**

Cada producto de PCR fue enviado a la empresa Functional Biosciences, Inc., MGE Innovation Center, 505 South Rosa Road, Suite 238, Madison, WI 53719, para el secuenciado en ambas direcciones

La corrección de secuencias se realizó con los programas Pregap y Gap incluidos en el paquete de software Staden.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Colección entomológica**

Un total de 4.453 especímenes pertenecientes al género *Culicoides spp.* fueron colectados; de los cuales 3838 fueron capturados en Yasuní-Tiputini, 73 en Cofán-Dureno ambos sitios localizados en la Amazonía, 323 en Pacto en el piedemonte de la Cordillera Occidental y 219 en Urkusiki en el Páramo Andino Occidental. El 77.9% de los especímenes fueron hembras y 22.1% machos (Tabla 6).

El uso de claves morfológicas permitió la identificación de 36 especies distribuidas en 5 subgéneros (*Anilomyia*, *Haematomyidium*, *Hoffmania*, *Mataemyia*, *Psychophaena*) y 9 grupos de especies (*acotylus*, *carpenteri*, *eublepharus*, *fluvialis*, *limai*, *pachymerus*, *reticulatus*, *stigmalis*, *leoni*). Además, se encontró que el 65.2% fueron especímenes del

subgénero *Hoffmania*, el 9,4% de *Psychophaena*, 2.6% de *Anilomyia*, 1.4% de *Haematomyidium* y el restante 21.4% pertenecen a otros subgéneros y grupos de especies.

Por otro lado, las especies *C. youngi*, *C. foxi*, *C. insignis*, *C. acotylus*, *C. belemensis*, *C. fluvialis*, *C. carvalhoi*, *C. lopesi*, *C. veroni*, *C. pachymerus*, *C. lyrinotatus*, *C. pauscienfuscatus*, *C. pifanoi*, *C. reticulatus* y *C. deanei* no han sido previamente en y constituyen nuevos registros para el Ecuador. Las especies *C. ginesi*, *C. neoparaensis*, *C. paraensis*, *C. diabolicus*, *C. castillae*, *C. foxi*, *C. insignis*, *C. acotylus*, *C. belemensis*, *C. pachymerus*, *C. pifanoi*, *C. reticulatus* y *C. deanei* la bibliografía los refiere como antropofílicas.

*C. insignis* vector del VLA se encontró en las localidades de Cofán - Dureno en la Amazonía y Pacto en el piedemonte de la Cordillera Occidental y *C. paraensis* vector de la fiebre de Oropuche se encontró en las muestras de Tiputini y Cofán - Dureno ambos en la Amazonía. Adicionalmente, *C. pachymerus* implicado en problemas de dermatozoonosis, se encontró en Tiputini.

## 7.2. Análisis molecular

Se amplificó los segmentos C1, D1, C2 y D2 (750 bp) del gen ribosomal 28S de 22 muestras, que correspondieron a las especies *C. metagonatus*, *C. paraensis*, *C. diabolicus*, *C. foxi*, *C. guttatus*, *C. hylas*, *C. bricenoi*, *C. venezuelensis*, *C. belemensis*, *C. eublepharus*, *C. leopoldoi*, *C. castillae*, *C. fluvialis*, *C. carvalhoi*, *C. veroni*, *C. pachymerus*, *C. lyrinotatus*, *C. limai*, *C. pauscienfuscatus*, *C. leoni*, *C. reticulatus*, *C. pifanoi* y *Culicoides* sp. (*Anilomyia*). Un espécimen del género *Atrichopogon* sp. (Diptera: Ceratopogonidae) fue utilizado como grupo externo.

El análisis de secuencias (597 pb) mostró la siguiente composición nucleotídica: T (29.4%), C (24.9%), A (29.2%) y G (16.5%). Los árboles obtenidos por los métodos de Neighbor joining (NJ) y Máximo de Parsimonia (MP) muestran topologías similares. Las especies pertenecientes a los subgéneros *Hoffmania* y *Anilomyia* se agrupan en dos clados. Cada grupo de especies estuvo representado por un solo espécimen con la excepción del grupo *fluvialis* (3 especies) que se muestra como un grupo parafilético. (Figura 10)

## 8. DISCUSIÓN

Los Culicoides generalmente muestran mayor actividad al atardecer y al amanecer; las colecciones para este estudio fueron realizadas entre las 18h00 y 06h00 aproximadamente con la finalidad de hacer coincidir los tiempos de colección con los tiempos de mayor actividad de los insectos. Varios estudios indican que las capturas realizadas con trampas de luz clara son más efectivas en especies con actividad crepuscular (Borkent & Spinelli, 2007) que en aquellas con actividad diurna como *C. paraensis* (vector de la Fiebre de Oropouche en zonas urbanas. Sin embargo, en este estudio se demostró que las trampas de luz blanca resultaron efectivas para capturar este espécimen que probablemente tiene una actividad mayormente crepuscular a diferencia de otras regiones geográficas (Borkent & Spinelli, 2007).

La presencia de la vena costal sin bordear el ala y la fusión de la misma a las venas radiales (McAlpine J., *et al.*, 1981); son las características morfológicas más relevantes, que permitieron la diferenciación de los miembros de la familia Ceratopogonidae de otras del suborden Nematóceras. El género *Culicoides* presenta patrones específicos de pigmentación en las alas (manchas claras y oscuras) y esta característica lo diferencia del resto de géneros de la familia Ceratopogonidae; a esto se suma la presencia de la vena r-m y las

celdas r1 y r2 bien visibles (desarrolladas). La observación de la genitalia y los dos primeros segmentos de las antenas, permitió diferenciar entre machos (22.1%) y hembras (77.9%) del total de especímenes colectados (4453). De acuerdo con el patrón macular del ala, se separó los especímenes en 4 subgéneros: *Hoffmania*, *Psychophaena*, *Anilomyia*, *Haematomyidium* y 9 grupos de especie *acotylus*, *carpenteri*, *eublepharus*, *fluvialis*, *limai*, *pachymerus*, *reticulatus*, *stigmalis* y *leoni*. Para la identificación a nivel de especie se recurrió a parámetros morfométricos: largo del ala, ratios “costal”, “probóscide/cabeza”, “índice flagelar”, “índice palpal”, y el número y morfología de la(s) espermateca(s). Con las medidas morfométricas se constató que el tamaño de los *Culicoides* es variada, los especímenes del subgénero *Psychophaena* son los de mayor tamaño (largo del ala 1.88 mm) a diferencia de los especímenes del grupo de especies *fluvialis* (largo del ala 0.69 mm) que son bastante pequeños (Wirth, Dyce & Spinelli, 1988).

Luego del análisis de caracteres morfológicos y morfométricos, se identificaron 36 especies de las cuales *C. ginesi*, *C. neoparaensis*, *C. paraensis*, *C. diabolicus*, *C. castillae*, *C. foxi*, *C. insignis*, *C. acotylus*, *C. belemensis*, *C. pachymerus*, *C. pifanoi*, *C. reticulatus* y *C. deanei* son consideradas antropofílicas. *C. youngi*, *C. foxi*, *C. insignis*, *C. acotylus*, *C. belemensis*, *C. fluvialis*, *C. carvalhoi*, *C. lopesi*, *C. vernoni*, *C. pachymerus*, *C. lyrinotatus*, *C. pauscienfuscatus*, *C. pifanoi*, *C. reticulatus* y *C. deanei* no han sido reportados hasta el momento y constituyen nuevos registros para el Ecuador incrementando la fauna descrita de *Culicoides* a 65 especies en total. En este estudio se encuentra que 28 especies de Ecuador se encuentran también en Colombia; y 22 especies están también presentes en Brasil.

La distribución de especies por regiones (Costa, Sierra, Amazonía) fue la siguiente: 26 especies se encontraron solamente en la Amazonía, 3 especies solamente en la Costa, 6



especies tanto en la Costa como en la Amazonía, y, 1 especie tanto en la Amazonía como en los Páramos Andinos. La mayor diversidad de especies de *Culicoides* fue encontrada en la Amazonía, en la zona de Tiputini, lo cual apoya los reportes de Zook (2010) y Bass *et al.* (2010) quienes atribuyeron a esta localidad la mayor biodiversidad del mundo en insectos (100.000 especies/Ha).

En este estudio se confirma la presencia de *C. insignis*, vector del Virus de la Fiebre Catarral Ovina en el neotrópico que afecta a ovinos, caprinos, bovinos y rumiantes silvestres. Estudios previos (Merino 2011) detectan la presencia de anticuerpos para VLA en ovinos, bovinos y caprinos en las provincias de Pichincha, Esmeraldas, Guayas, Manabí y El Oro. La presencia del vector y el virus en las mismas regiones nos pueden indicar que posiblemente *C. insignis* es la especie transmisora del virus de la fiebre catarral ovina en la costa ecuatoriana. Sin embargo, la presencia de *C. insignis* en la zona amazónica, no es concluyente para demostrar la presencia de la enfermedad puesto que no existen estudios en animales que demuestren la presencia de anticuerpos en ganado proveniente de la amazonía. La enfermedad y el vector han sido reportados en Brasil, Argentina y Colombia (Borkent & Spinelli, 2007) lo cual sugiere su posible dispersión a la ganadería de la amazonía; por el contrario en ninguno de los países de la zona andina se ha reportado la presencia de la enfermedad en la zona costera (occidente de los Andes).

La identificación de *C. paraensis* en la Amazonía (Tiputini y Cofán - Dureno) y la existencia de un estudio que reporta la presencia de anticuerpos para el OROV en 1 de 300 pacientes investigados en la provincia de Pastaza (Manock *et al.*, 2009) aporta evidencias de que esta especie podría ser el vector del OROV en esta zona; para confirmar este rol epidemiológico se requiere el aislamiento e identificación del virus, así como demostrar la

capacidad vectorial de la especie en la transmisión del virus en el ciclo urbano (Borkent & Spinelli, 2007; panafotsa, 2006)

Por otro lado, *C. pachymerus* – agente causal de dermatozoonosis en el piedemonte de la cordillera oriental de Boyacá, en Colombia (Carrasquilla *et al.*, 2010) – fue identificado en las muestras de Tiputini. La presencia de esta especie ha sido reportada desde Guatemala hasta Colombia y Brasil (Amazonas) y constituye el primer reporte para el Ecuador. Al igual que *C. venezuelensis* (una de las especies que afecta a la ganadería bovina; Perruolo, 2009). Resulta interesante que esta especie también se encuentra en la Costa y la zona baja amazónica, lo cual sugiere su gran capacidad de adaptación. La presencia de algunas especies en ambos lados de la cordillera abre espacio al estudio de especies crípticas, como sucede en otros dípteros como *Lutzomyia longipalpis*, donde se ha encontrado especies similares en morfología, pero genéticamente diferentes debido al aislamiento geográfico generado por la presencia de la cordillera de los Andes (Conn & Mirabello, 2007).

Las topologías de los árboles obtenidos por los métodos de Neighbor Joining (NJ, Figura 10A) y Máximo de Parsimonia (MP, Figura 10B) son similares. Ambos, sugieren la individualización de los subgéneros *Hoffmania* y *Anilomyia* con altos valores de bootstrap (<70%). La ubicación filogenética de estos dos subgéneros tiene correspondencia con la clasificación morfológica, donde la presencia de una mácula clara sobre la celda r2 los separa del resto de subgéneros y grupos de especies. Asimismo dentro del subgénero *Hoffmania* se observa la separación de los “grupos de especies” *guttatus e hylas*; similar a la agrupación basada en parámetros morfológicos y morfométricos. En lo referente a las especies del grupo de especies *fluvialis* estas se encuentran distribuidas en 3 clados diferentes, lo que sugiere que las características morfológicas que los agrupan podrían ser resultado de una evolución paralela. Por otro lado, la clasificación de los subgéneros

*Haemotomyidium*, *Psychophaena*, *Mataemyia* y los grupos de especies analizados no está resuelta debido a que se analizó un solo espécimen de cada subgénero. Los resultados obtenidos confirman la necesidad de una reclasificación del género *Culicoides* considerada como “caótica” (Borkent, 2012) con base en características morfológicas y moleculares. Además, se requiere la incorporación de un mayor número de especies de Ecuador y otros países de Sudamérica en el estudio molecular y su comparación con la clasificación tradicional vigente.

## 9. CONCLUSIONES

En esta investigación se reporta la presencia de 36 especies del género *Culicoides* en la zona norte del Ecuador. De las cuales 16 son nuevos registros para el Ecuador y 13 especies son consideradas antropofílicas en otros estudios (Wirth, Dyce & Spinelli 1988; Borkent & Spinelli, 2007; Mihn, 2010;)

En el borde norte del Parque Nacional Yasuní (Tiputini) se encontró el mayor número de especies, posiblemente debido a las condiciones geográficas y climáticas favorables que contribuyen a la alta diversidad.

En la zona norte del Ecuador están presentes las especies identificadas como vectores de Fiebre Catarral Ovina en rumiantes (*C. insignis*) y la Fiebre de Oropouche en humanos (*C. paraensis*) en otros países (Tanya, Greiner, & Gibbs, 1992; Borkent & Spinelli, 2007; Carrasquilla *et al.*, 2010; Santamaría *et al.*, 2011)

La clasificación de *Culicoides* basada en caracteres morfológicos y morfométricos merece un estudio a nivel molecular para resolver la posición taxonómica de ciertos subgéneros y grupos de especie.

## 10. RECOMENDACIONES

La extensión del estudio a otras regiones geográficas en donde se incluya gradientes de altura para determinar la distribución de especies. De igual manera, se requiere realizar colecciones entomológicas en diferentes períodos del año.

Es importante emprender , estudios de confirmación de la presencia del virus de la Lengua Azul en especímenes de *C. insignis* y del virus de Oropuche en especímenes de *C. paraensis* con capturas en las zonas de estudio donde se ha encontrado anticuerpos para ambos virus

En este estudio se encontraron especímenes recién alimentados (con sangre fresca en el abdomen); se recomienda que se haga un estudio molecular de estas muestras para determinar las preferencias tróficas de las diferentes especies de *Culicoides*.

Este estudio tiene una limitación de representatividad de algunas zonas ecológicas de las Provincias de la Zona Norte del Ecuador. Por ejemplo no se realizó capturas en zonas costeras, en manglares y otros hábitats, donde su abundancia ha sido reportada como una limitante para el desarrollo de actividades como también para la expansión de las poblaciones humanas.

## 11. REFERENCIAS

- Augot, D., Sauvage, F., Jouet, D., Simphal, E., Veuille, M., Couloux, A., y otros. (2010). Discrimination of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus*, potential bluetongue vectors, by morphometrical and mitochondrial cytochrome oxidase subunit I analysis. *Infection, Genetics and Evolution*, *10*, 629–637.
- Baisley, K., Watts, D., Munstermann, L., & Wilson, M. (1998). Epidemiology of endemic Oropouche virus transmission in upper Amazonina Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *59*(5), 710-716.
- Balczun, C., Vorsprach, B., Meiser, C., & Schaub, G. (2009). Changes of the abundance of *Culicoides obsoletus* s.s. and *Culicoides scoticus* in Southwest Germany identified by a PCR-based differentiation. *Parasitol Res*, *105*, 345-349.
- Bass, M., Finner, M., Jenkins, C., Kreft, H., Cisneros, D., McCracken, S., y otros. (2010). Global Conservation Significance of Ecuador's Yasuní National Park. *PLoS ONE*, *5*(1), e8767.
- Beckenbach, A., & Borkent, A. (2003). Molecular analysis of the biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit 2. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *27*, 21–35.
- Bernardes, A., Vieira, R., Paiva, B., Da Silva, M., Santos, N., Urbano, M., y otros. (Feb. de 2009). Sporadic Oropouche virus infection, Acre, Brazil. *Letters, Emerging Infectious Diseases*, *15*(2), 348-350.
- Blackwell, A. (01 de 01 de 2008). *Biting Midges, Culicoides Spp. (Diptera: Ceratopogonidae)*. (S. S. B.V., Ed.) Recuperado el 29 de 06 de 2012, de Springerlink:  
<http://www.springerlink.com/content/h6x76755815v73u7/fulltext.html>
- Blackwell, A. (01 de 01 de 2008). *Biting Midges, Culicoides Spp. (Diptera: Ceratopogonidae)*. Recuperado el 11 de 06 de 2012, de Encyclopedia of Entomology: <http://www.springerlink.com/content/t722562435702123/fulltext.html>
- Bobbi Antoniassi, N. A. (2010). *Aspectos clínicos e patológicos da infeccao pelo Virus da Lingua Azul em ovinos no Estado do Rio Grabde do Sul*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária. Porto Alegre: UFRGS.
- Borkent, A. (2012, Feb. 28).  
<http://www.inhs.uiuc.edu/research/FLYTREE/CeratopogonidaeCatalog.pdf>. *World Species of Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae)*. Salmon Arm, British Columbia, Canada. Retrieved Mar. 11, 2012, from  
<http://www.inhs.uiuc.edu/research/FLYTREE/CeratopogonidaeCatalog.pdf>

- Borkent, A., & Spinelli, G. R. (2007). *Neotropical Ceratopogonidae (Diptera: Insecta)* (Vol. 4). (J. Adis, J. Arias, G. Rueda-Delgado, & K. Wanssen, Edits.) Sofia, Bulgaria: Pensoft.
- Braverman, Y. (1994). Nematocera (Ceratopogonidae, Psychodidae, Simuliidae and Culicidae) and control methods. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 13(4), 1175-1199.
- Calvo de Pablo, P. (2009). *Caracterización filogenética de Phacodinium metchnikoffi: analisis comparativo de datos morfológicos, morfogenéticos y moleculares*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Cameron, S., Lambkin, C., Barker, S., & Withing, M. (2007). A mitochondrial genome phylogeny of Diptera: whole genome sequence data accurately resolve relationships over broad timescales with high precision. *Systematic Entomology*, 32, 40-59.
- Carrasquilla, M. C., Guhl, F., Zipa, Y., Ferro, C., Pardo, R. H., Cabrera, O. L., y otros. (March de 2010). Breeding sites of *Culicoides pachymerus* Lutz in the Magdalena River basin, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105(2), 216-219.
- Chen, R., Tsai, C., & Tzeng, W. (2009). 16S and 28S rDNA sequences in phylogenetic analyses of freshwater prawns (*Macrobrachium* Bate, 1868) from Taiwan. *Journal of Crustacean Biology*, 29(3), 400-412.
- Conn, J., & Mirabello, L. (2007). The biogeography and population genetics of neotropical vector species. *Nature*(99), 245-256.
- Cruz Barraqueta, L. E. (2009). *Eficiencia reproductiva de vacas Holstein con metritis tratadas con cefalosporinas y oxitetraciclina*. Universidad San Francisco de Quito, Veterinaria. Quito: USFQ.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2007). Bluetongue. *The EFSA Journal*, 1-194.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2012). "*Schmallenberg*" virus: likely epidemiological scenarios and data needs European Food Safety Authority. Parma: EFSA.
- Fecchio, A. (2011). *Prevalencia, diversidade e estrutura da comunidade de hemoparasitos (Haemoproteus e Plasmodium) em aves do Cerrado de Brasil Central*. Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas. Brasília: Universidad de Brasília.
- Felippe-Bauer, M., Bauer, P., & Silva, F. (1989). Scanning electron microscopy of the antennal sensilla in female *Culicoides paraensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84(4), 463-469.

- Felippe-Bauer, M., Pinto, C., Py-Daniel, V., & Spinelli, G. (2009). *Culicoides baniwa* sp.nov. from the Brazilian Amazon Region with a synopsis of the hylas species group (Diptera: Ceratopogonidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(6), 851-857.
- Forattini, O. P. (2002). *Culicidología Médica, vol 2: Identificacao, Biologia, Epidemiologia* (Vol. 2). Sao Paulo: Editora da Universidade de Sao Paulo.
- Garros, C., Mathieu, B., Balenghien, T., Cêtre-Sossah, C., & Delécolle, J.-C. (2010). Suggesting synonymies? Comments on Kiehl *et al.* (2009) “The European vectors of Bluetongue virus: are there species complexes, single species or races in *Culicoides obsoletus* and *C. pulicaris* detectable by sequencing ITS-1, ITS-2 and 18S-rDNA?”. *Parasitol Res*, 107, 731–734.
- Gomulski, L., Meiswinkel, R., Delecolle, J., 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*, 30, 229-238.
- Gomulski, L., Meiswinkel, R., Delecolle, J.-C., Goffredo, M., & Gasperi, G. (2005). Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera, Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Systematic Entomology*, 30, 619-631.
- Hillis, D. M., & Dixon, M. T. (Diciembre de 1991). Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66(4), 411-453.
- I.A., L. (2004). Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Vet. Ital.*, 40(3), 89-93.
- Instituto Geográfico Militar (IGM). (2012). *Mapa Geográfico del Ecuador 1:500.000*. Quito: IGM.
- ISID. (01 de 01 de 2010). *ProMEDmail: International Society for Infectious Diseases*. Recuperado el 20 de Abril de 2012, de <http://www.promedmail.org/>
- Jannotti-Passos, L., Ruiz, J., Caldeira, R., Murta, S., Coelho, M., & Carvalho, O. (Julio de 2010). Phylogenetic analysis of *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Mollusca: Gastropoda). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105(4), 504-511.
- Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C., Leslie, K., Walton, J., y otros. (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 62, 9-23.
- Kiehl, E., Walldorf, V., Klimpel, S., Al-Quraishy, S., & Mehlhorn, H. (2009). The European vectors of Bluetongue virus: are there species complexes, single species or races in *Culicoides obsoletus* and *C. pulicaris* detectable by sequencing ITS-1, ITS-2 and 18S-rDNA? *Parasitol Res*, 105, 331–336.

- Kline, D., & Axtell, R. (1999). Sensilla of the Antennae and Maxillary Palps of *Culicoides hollensis* and *C. melleus* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*, 36(4), 493-502.
- Lassen, S. B., Nielsen, S. A., & Kristensen, M. (2012). Identity and diversity of blood meal hosts of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides* Latreille) in Denmark. *Parasites & Vectors*, 143(5), 7.
- Lillie, T. H. (1985). *Diel and seasonal activities of Culicoides spp. near Yankeetown, Florida*. University of Florida, Entomology and Nematology. University of Florida: University of Florida.
- Lopes da Trindade, R., & de Sousa, I. (2010). Jejenes (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*), luego de la estación de lluvias, en la Reserva de Desarrollo Sostenible Itatupã-Baquiá, Gurupá, Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude*, 1(2), 121-130.
- Manock, S. R., Jacobsen, K. H., Brito de Bravo, N., Russell, K. L., Negrete, M., Olson, J. G., y otros. (2009). Etiology of Acute Undifferentiated Febrile Illness in the Amazon Basin of Ecuador. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(1), 146-151.
- Manock, S., Jacobsen, K., Brito, N., Russell, K., Negrete, M., Olson, J., y otros. (2009). Etiology of Acute Undifferentiated Febrile Illness in the Amazon Basin of Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 81(1), 146-151.
- Matsumoto, Y., Yanase, T., Tsuda, T., & Noda, H. (2009). Species-specific mitochondrial gene rearrangements in biting midges and vector species identification. *Medical and Veterinary Entomology*, 23, 47-55.
- McAlpine, J., Peterson, B., Shewell, G., H.J., T., Vockeroth, J., & Wood, D. (1981). *Manual of Nearctic Diptera. Vol. 1, Agriculture, Monograph 27* (Vol. 1). Ottawa: Research Branch Agriculture Canada.
- Mengual, X., Stahls, G., & Rojo, S. (2007). First phylogeny of predatory hoverflies (Diptera, Syrphidae, Syrphinae) using mitochondrial COI and nuclear 28S rRNA genes: conflict and congruence with the current tribal classification. *Cladistics*, 1-47.
- Merck Sharp & Dohme, C. (31 de Mayo de 2012). *BUTOX: Culicoides*. Recuperado el 26 de Junio de 2012, de MSD Animal Health: <http://www.butox-info.com/ectoparasites/behaviour-culicoides.asp>
- Merino M., C. (2011). *Identificación de anticuerpos precipitantes para el virus de la lengua azul en suero de ovinos de la parte alta y baja de la provincia de Pichincha*. Quito: UDLA.



- Mihn Hoan, T. (2010). *Contribution a l'étude des Ceratopogonidae de nouveau monde: le genre Culicoides Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) morphologie, importance médicale et vétérinaire, description des espèces de la Guyane Française*. Paris: Université Paris.
- Morag, N., Saroya, Y., Braverman, Y., Klement, E., & Gottlieb, Y. (2012). Molecular Identification, Phylogenetic Status, and Geographic Distribution of *Culicoides oxystoma* (Diptera: Ceratopogonidae) in Israel. *PLoS ONE*, 7 (3)(e33610), 1-7.
- National Institute of Health. (13 de Junio de 2012). *National Human Genome Research Institute*. Recuperado el 20 de Octubre de 2012, de Human Genome: <http://www.genome.gov/25520880>
- OIE. (2012). *OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal*. Recuperado el 24 de Abril de 2012, de <http://www.oie.int>
- Ortiz, I., & León, L. A. (5 de Enero y Febrero de 1955). *Los culicoides (díptera: ceratopogonidae) de la República del Ecuador* (Vol. 67). Quito: Casa de la Cultura Ecuatoriana.
- panafotsa;. (2006). Fiebre de Oropouche. *Panaftosa*, 283-287.
- Pawlowski, J., Szadziwski, R., Kmiecziak, D., Fahrni, J., & Bittar, G. (1996). Phylogeny of the infraorder Culicomorpha (Diptera: Nematocera) based on 28S RNA gene sequences. *Systematic Entomology*, 21, 167-178.
- Pérez, A. C. (2012). *Estudio comparativo de la respuesta inmune inducida por dos tipos de vacunas (VLP e inactivada) frente al virus de la lengua azul en el ganado ovino*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Perrin, A., Cetre-Sossah, C., Mathieu, B., Baldet, T., Delecalle, J., & Albina, E. (2006). Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. *Medical and Veterinary Entomology*, 20, 219-228.
- Perruolo, G. (2009). Clave de las especies de *Culicoides* (Díptera: Ceratopogonidae) asociadas con la ganadería en la Región Neotropical. *Revista Científica FCV-LUZ*, XIX(2), 124-133.
- Phayuhasena, S., Colgan, D., Kuvangkadilok, C., Pramual, P., & Baimai, V. (2010). Phylogenetic relationships among the black fly species (Diptera: Simuliidae) of Thailand based on multiple gene sequences. *Genetica*, 138, 633-648.
- Pili, E., Carcangiu, L., Oppo, M., & Marchi, A. (2010). Genetic structure and population dynamics of the biting midges *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus*: implications for the transmission and maintenance of bluetongue. *Medical and Veterinary Entomology*, 24, 441-448.

- Ramilo, D., Diaz, S., Pereira, I., Delecollé, J.-C., Wilson, A., Meireles, J., y otros. (2012). First Report of 13 Species of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) in Mainland Portugal and Azores by Morphological and Molecular Characterization. *Plos One*, 7(4)(e34896), e34896(1-12).
- Santamaría, E., Cabrera, O., Zipa, Y., Ferro, C., Ahumada, M., & Pardo, R. (2008). Diagnóstico preliminar de la molestia sanitaria causada por Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) en el departamento de Boyacá, Colombia. *Biomédica*, 497-509.
- Santana, R. M. (2010). *avaliação de eficácia de produtos biocidas no processo de Autorização para comercialização, e sua aplicação no controlo de Culicoides em surtos de Língua Azul*. Lisboa: Universidade Técnico de Lisboa.
- Sherlock, I., & Guitton, N. (1964). I Entomological survey. Dermatozoonosis by Culicoides bite (Diptera: Ceratopogonidae) in Salvador State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 62, 56-65.
- Sherlock, I., & Guitton, N. (1964). II. The bionomics of Culicoides. Dermatozoonosis by Culicoides bite (Diptera: Ceratopogonidae) in Salvador State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 62, 146-160.
- Sherlock, I., & Guitton, N. (1965). III. Epidemiological aspects. Dermatozoonosis by Culicoides bite (Diptera: Ceratopogonidae) in Salvador State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 63, 7-18.
- Sherlock, I., & Guitton, N. (1965). IV. A clinical study. Dermatozoonosis by Culicoides bite (Diptera: Ceratopogonidae) in Salvador State, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 63, 32-42.
- Smolis, S. (2011). *Systématique moléculaire du genre Culicoides Latreille (Diptera, Ceratopogonidae): étude pilote*.
- Spinelli, G., Ronderos, M., Díaz, F., & Marino, P. (2005). The bloodsucking biting midges of Argentina (Diptera: Ceratopogonidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100(2), 137-150.
- Tabachnick, W. J. (2010). Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease episytems in a changing world. *The Journal of Experimental Biology*, 213, 946-954.
- Tanya, V., Greiner, E., & Gibss, E. (1992). Evaluation of Culicoides insignis (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus. *Veterinary Microbiology*, 32, 1-14.
- Tomich, R., Nogueira, M., Lacerda, A., Campos, F., Tomas, W., Herrera, H., y otros. (2009). Sorologia para o vírus da língua azul em bovinos de corte, ovinos e veados

- campeiros no Pantanal sul-mato-grossense. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 61(5), 1222-1226.
- USDA. (Julio de 1999). The bluetongue triangle. *Agricultural Research Magazine*, 47(7), 4-6.
- Wiegmann, B., Trautwein, M., Winkler, I., Barr, N., Kim, J., Lambkin, C., y otros. (14 de Marzo de 2011). Episodic radiations in the fly tree of life. *PNAS*, 1-6.
- Wirth, W. W., & Blanton, F. S. (1959). Biting midges of the genus *Culicoides* from Panama (Diptera:Heleidae). *Proceedings of the United States National Museum*, 109(3415), 246.
- Wirth, W., Dyce, A., & Spinelli, G. (1988). *An Atlas of Wing Photographs: With a Summary of the Numerical Characters of the Nearctic Species of Culicoides (Diptera : Ceratopogonidae)* (Vol. 22). American Entomological Institute.
- Yeates, D., Wiegmann, B., Courtney, G., Meier, R., Lambkin, C., & Pape, T. (2007). Phylogeny and systematics of Diptera: Two decades of progress and prospects. *Zootaxa*, 565–590.
- Zook, D. (2010). Tropical rainforests as dynamic symbiospheres of life. *Symbiosis*, 51, 27–36.

## 12. TABLAS

**Tabla 1.-**Reporte del VLA a la OIE, datos del 2005 al 2012.

Adaptado de: [http://web.oie.int/wahis/public.php?page=disease\\_timelines](http://web.oie.int/wahis/public.php?page=disease_timelines)

País	Estado para periodos de seis meses														
	2005		2006		2007		2008		2009		2010		2011		2012
	Ene-Jun	Jul-Dic	Ene-Jun	Jul-Dic	Ene-Jun	Jul-Dic	Ene-Jun	Jul-Dic	Ene-Jun	Jul-Dic	Ene-Jun	Jul-Dic	Ene-Jun	Jul-Dic	Ene-Jun
Argentina															
Bolivia															
Brasil															
Chile															
Colombia															
Ecuador															
Guyana Fr.															
Guyana															
Paraguay															
Perú															
Suriname															
Uruguay															
Venezuela															

	No hay información disponible de esta enfermedad
	Nunca reportado
	Enfermedad no reportada durante este periodo
	Enfermedad se sospecha pero no confirmado
	Infección confirmada pero no hay enfermedad clínica
	Infección clínica confirmada
	Infección confirmada pero limitado a ciertas zonas

En cada periodo, el recuadro superior representa la situación en los animales domésticos y el recuadro inferior la situación en los animales silvestres.

**Tabla 2.**-Clasificación taxonómica completa del género *Culicoides*

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=58262&lvl=3&p=mapview&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> Acceso: Octubre 20, 2012

<b>Taxa</b>	<b>Nombre</b>
Dominio	Eukaryota
	Opisthokonta
Reino	Metazoa
	Eumetazoa
	Bilateria
	Coelomata
	Protostomia
	Ecdysozoa
	Panarthropoda
Filum	Arthropoda
	Mandibulata
	Pancrustacea
Superclase	Hexapoda
Clase	Insecta
	Dicondylia
	Pterygota
Subclase	Neoptera
Infraclase	Endopterygota
Orden	Diptera
Suborden	Nematocera
Infraorden	Culicimorpha
Superfamilia	Chironomoidea
Familia	Ceratopogonidae
Subfamilia	Ceratopogoninae
Tribu	Culicoidini
Género	<i>Culicoides</i>

**Tabla 3.-** Subgéneros y Grupos de especie de *Culicoides* Neotropicales

(Adaptado de Borkent &amp; Spinelli, 2007).

Taxón	Número de especies	
	Total	Hematófagas
<b>Subgénero</b>		
<i>Amossovia</i> GLUKHOVA, 1989: 226	1	0
<i>Anilomyia</i> VARGAS, 1960: 37	17	0
<i>Avaritia</i> FOX, 1955: 218	8	6
<i>Beltramyia</i> VARGAS, 1953a: 34	3	1
<i>Cotocripus</i> BRETHERS, 1912: 451	5	2
<i>Culicoides</i> LATREILLE	4	0
<i>Diphaomyia</i> VARGAS, 1960: 40	13	5
<i>Drymodesmyia</i> VARGAS, 1960: 40	13	2
<i>Glaphiromyia</i> VARGAS, 1960: 41	2	0
<i>Haematomyidium</i> GOELDI, 1905: 137	36	15
<i>Hoffmania</i> FOX, 1948: 21	39	14
<i>Macfiella</i> FOX, 1955: 217	2	1
<i>Mataemyia</i> VARGAS, 1960: 43	15	1
<i>Oeacta</i> POEY, 1853: 238	5	2
<i>Psychophaena</i> PHILIPPI, 1865: 628	2	0
<b>Grupo de especies sin subgénero</b>		
Grupo <i>acotylus</i>	4	1
Grupo <i>carpenteri</i>	3	1
Grupo <i>daedalus</i>	12	0
Grupo <i>dasyophrus</i>	4	1
Grupo <i>eublepharus</i>	12	1
Grupo <i>fluvialis</i>	10	1
Grupo <i>leoni</i>	6	2
Grupo <i>limai</i>	11	0
Grupo <i>monticola</i>	3	0
Grupo <i>pachymerus</i>	7	3
Grupo <i>reticulatus</i>	15	4
Grupo <i>stigmalis</i>	4	3
Grupo <i>stonei</i>	1	1
<b>Especies Misceláneo sin ubicación</b>	<b>9</b>	<b>3</b>
<b>Total</b>	<b>266</b>	<b>70</b>

**Tabla 4.-** Especies de *Culicoides* registradas en Ecuador y su distribución en el Neotrópico.\* Especies de *Culicoides* vectores del virus de la fiebre catarral ovina en el Neotrópico;\*\* Especie de *Culicoides* vectores del virus de Oropouche en el Neotrópico.

Taxón	Especie	Distribución Neotrópico
<b>Subgénero</b>		
<i>Anilomyia</i>	<i>C. efferus</i> Fox 1952	Guatemala hasta Perú y Bolivia
	<i>C. metagonatus</i> Wirth and Blanton 1956b	Nicaragua hasta Ecuador
<i>Avaritia</i>	<i>C. pusillus</i> Lutz 1913*	USA (Florida), México (Chiapas) hasta el noreste de Argentina.
<i>Haematomyidium</i>	<i>C. equatoriensis</i> Barbosa 1952	Ecuador
	<i>C. ginesi</i> Ortiz 1951	Venezuela (Aragua); Brasil (Para, Belem); El Salvador hasta Ecuador
	<i>C. glabrior</i> Macfie 1940	Honduras hasta Ecuador, Guyana, Surinam, Trinidad, Brasil (Para)
	<i>C. insinuatus</i> Ortiz and León	Colombia, Ecuador, Perú, Trinidad, Guyana, Brasil (Amazonas, Pará, Sao Paulo)
	<i>C. limonensis</i> Ortiz and León 1955	Ecuador, Venezuela, Brasil (Para, Sao Paulo, Santa Catarina), Colombia
	<i>C. neoparaensis</i> Tavares and Souza 1978	Ecuador, Brasil (Amazonas, Rio de Janeiro, Santa Catarina), Colombia; Argentina (norte)
	<i>C. paraensis</i> Goeld 1905**	USA (CO, KA, OK, NB, DS), Costa Rica, Ecuador, Perú, Venezuela, Brasil (Pará, Belem), Argentina, Paraguay, Guyana Francesa, San Vicente
<i>Hoffmania</i>	<i>C. batesi</i> Wirth and Blanton 1973	Guatemala, Colombia, Ecuador, Bolivia, Brasil (Para)
	<i>C. contubernalis</i> Ortiz & Leon 1955	Ecuador, Perú
	<i>C. diabolicus</i> Hoffman 1925	México hasta Venezuela y Ecuador, Colombia, Guyana, Argentina, Brasil, Bolivia (Centro y Sudamérica)
	<i>C. filarifer</i> Hoffman 1939 *	México, Nicaragua, Trinidad, Ecuador, Brasil
	<i>C. fusipalpis</i> Wirth and Blanton 1973	El Salvador hasta Ecuador, Bolivia, Guyana Francesa, Guyana, Surinam, Brasil (Para, Belem)
	<i>C. guttatus</i> Coquillett 1904	Brasil; Venezuela; Paraguay; Argentina; Surinam; Ecuador

	<i>C. heliconiae</i> Fox and Hoffman 1944	Bélice hasta Ecuador, Venezuela, Granada, Trinidad y Tobago, Perú
	<i>C. hylas</i> Macfie 1940	México, Nicaragua (Zelaya), Costa Rica, Panamá, Colombia, Guyana, Ecuador, Perú, Brasil.
	<i>C. ocumarensis</i> Ortiz 1950	México, Costa Rica, América Central & Antillas, Venezuela, Brasil, Ecuador
	<i>C. pseudodiabolicus</i> Fox 1946	Honduras, Nicaragua (Zelaya), Panamá, Trinidad, Ecuador, Brasil.
	<i>C. tidwelli</i> Spinelli 1993	Honduras hasta Ecuador
	<i>C. trinidadensis</i> Hoffman 1925	Costa: Honduras y El Salvador hasta Colombia, Ecuador hasta Surinam, Cuba e Islas Caimán a Trinidad, Haití
	<i>C. verecundus</i> Macfie 1948	México (Chiapas) hasta Ecuador
<i>Macfiella</i>	<i>C. phlebotomus</i> (Williston) 1896	México (Sinaloa) hasta Ecuador, Jamaica hasta Brasil (Maranhao), Guyana Francesa
<i>Mataemyia</i>	<i>C. bricenoi</i> Ortiz 1951	Ecuador, Venezuela, Bolivia, Brasil (Amazonas, Para)
	<i>C. dicrourus</i> Wirth and Blanton 1955b	México, Honduras, Nicaragua, Costa Rica hasta Ecuador
<i>Oecacta</i>	<i>C. alahialinus</i> Barbosa 1952	Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador
	<i>C. barbosai</i> Wirth and Blanton 1956	USA (Florida) hasta Ecuador
	<i>C. furens</i> (Poey) 1853	USA (MA hasta FL y TX), México (Campeche, Santiago, Sinaloa, Yucatán, Veracruz) y el Caribe hasta Ecuador, Guyana, Surinam, Venezuela, Antillas, costa de Brasil
<i>Psychophaena</i>	<i>C. venezuelensis</i> Ortiz & Mirsa 1950	Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador, Bolivia, Chile, Argentina-Paraguay (Paraná), Uruguay, Brasil
<hr/>		
<b>Grupo de especies sin subgénero</b>		
<i>Grupo carpenteri</i>	<i>C. camposi</i> Ortiz and León 1955	Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador
	<i>C. carpenteri</i> Wirth and Blanton 1953	Costa Rica, Panamá (Zona del canal), Ecuador, Bolivia, Brasil (Amazonas)
<i>Grupo dasyophrus</i>	<i>C. dasyophrus</i> Macfie 1940d	Colombia, Ecuador, Venezuela, Guyana, Brasil (Amazonas, Mato Grosso, Para)
<i>Grupo eublepharus</i>	<i>C. eublepharus</i> Macfie 1948	México (Chiapas), Costa Rica hasta Ecuador, Venezuela, norte de Brasil



	<i>C. propriipennis</i> Macfie 1948	México (Chiapas) hasta Panamá, Ecuador, Colombia, Venezuela and norte de Brasil
	<i>C. rangeli</i> Ortiz and Mirsa 1952	México (Oaxaca) hasta Ecuador, Bolivia, Venezuela, Trinidad, Brasil (Amazonas)
Grupo <i>fluvialis</i>	<i>C. balsapambensis</i> Ortiz & León 1955	Ecuador, Brasil, Costa Rica, Panamá, Colombia
	<i>C. castillae</i> Fox 1946	Guatemala hasta Ecuador, Venezuela, Trinidad, Honduras, Costa Rica, Panamá
	<i>C. leopoldoi</i> Ortiz 1951	El Salvador, Honduras, Costa Rica, Colombia, Ecuador; Bolivia, Argentina, Paraguay, Brasil, Guyana Francesa, Surinam, Trinidad
	<i>C. tetrathyris</i> Wirth and Blanton 1959	Honduras a Ecuador, Trinidad, Surinam, norte de Brasil
Grupo <i>leoni</i>	<i>C. gabaldoni</i> Ortiz 1954	México (Tabasco) hasta Ecuador, Venezuela, Trinidad, Brasil (Bahía),Paraguay, noreste de Argentina, Guyana, Guyana Francesa, Surinam, Bolivia
	<i>C. glabellus</i> Wirth and Blanton 1956	Honduras hasta Ecuador, Trinidad, Brasil (Bahía, Para), Venezuela
	<i>C. leoni</i> Barbosa 1952	Ecuador, Colombia
Grupo <i>limai</i>	<i>C. limai</i> Barretto 1944	El Salvador hasta Ecuador, Brasil (Para, Mato Grosso, Sao Paulo, Rio de Janeiro, Santa Catarina) hasta el noreste de Argentina, Paraguay
Grupo <i>monticola</i>	<i>C. monticola</i> Wirth and Lee 1967	Costa Rica hasta Ecuador
Grupo <i>reticulatus</i>	<i>C. paucienfuscatus</i> Barbosa 1947	Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil, Guyana Francesa, Trinidad
Grupo <i>stigmalis</i>	<i>C. alvarezi</i> Ortiz 1957	Venezuela, Ecuador
	<i>C. fluviatilis</i> Lutz 1914	Colombia, Ecuador, Bolivia, Venezuela, Trinidad, Brasil (Amazonas)

---

**Tabla 5.** - Ubicación geográfica de sitios de colección de *Culicoides*.

<b>Sitio</b>	<b>Región</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>	<b>Altitud (m.s.n.m.)</b>
Estación de Biodiversidad Tiputini	Amazonía (Orellana)	S0°38`6.86``	W76°08`35.86``	229
Pacto	Estribación Occidental (Pichincha)	N0°08`37.05``	W78°48`04.75``	1458
Cofán-Dureno	Amazonía (Sucumbíos)	N0°02`41.16``	W76°41`47.93``	274
Urkusiki	Cordillera Occidental (Imbabura)	N0°18`14.42``	W78°23`01.47``	3464

**Tabla 6.-** Especímenes colectados e identificados por sitio. Clasificación en hembras (♀) y machos (♂)

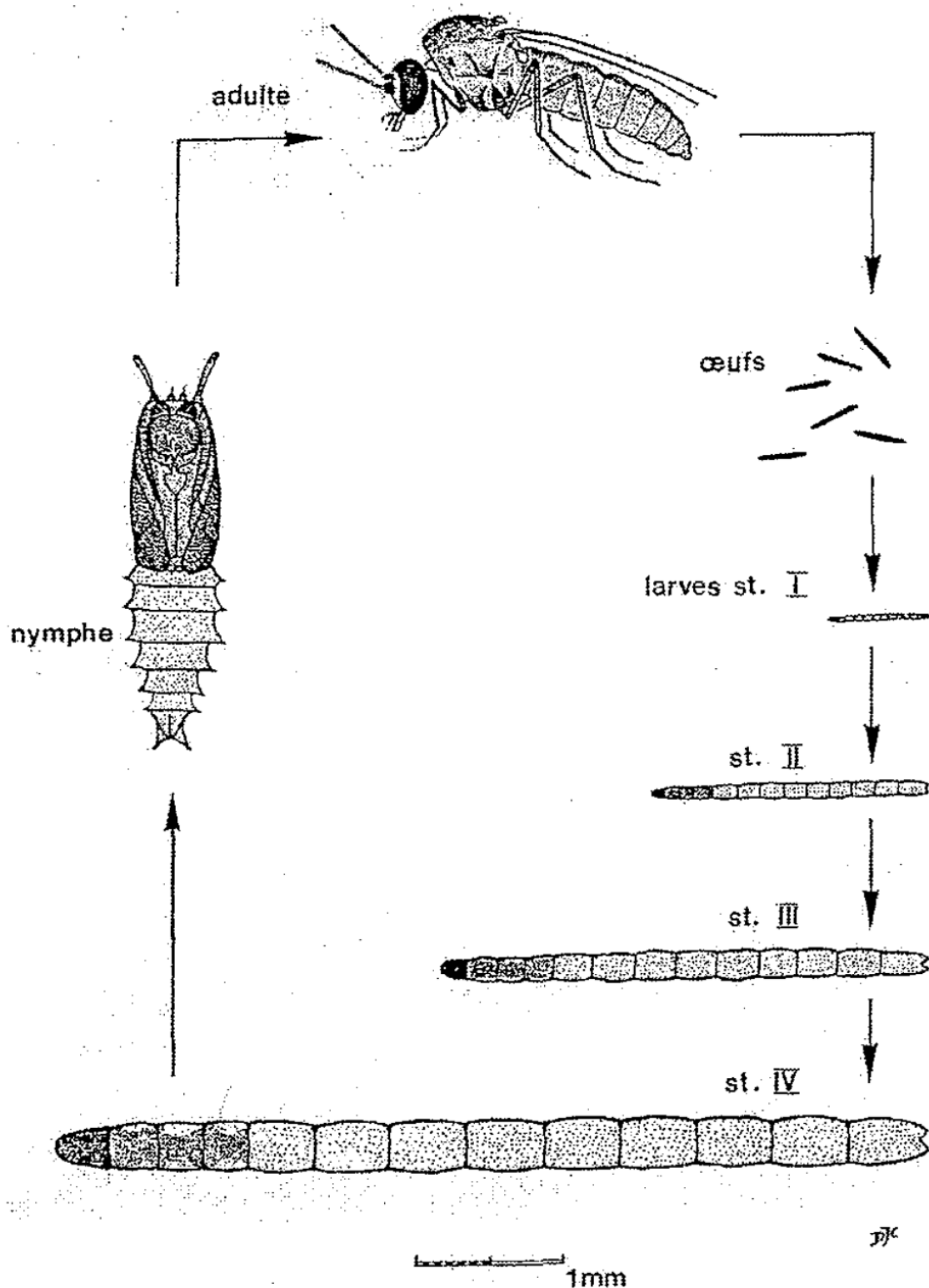
<b>Sitio</b>	<b>Especímenes colectados</b>			<b>Especímenes identificados</b>
	♀	♂	<b>Subtotal</b>	♀
Tiputini TBS	2857	981	3838	143
Pacto	322	1	323	80
Cofan-Dureno	72	1	73	23
Urkusiki	218	1	219	2
<b>TOTAL</b>	<b>3469</b>	<b>984</b>	<b>4453</b>	<b>248</b>

**Tabla 7.-** Distribución de especies identificadas en el presente estudio.

Taxón	Especie	Distribución Norte del Ecuador
<b>Subgéneros</b>		
<i>Anilomyia</i>	<i>C. metagonatus</i>	Pacto, Tiputini
	<i>C. sp.</i>	Tiputini
<i>Haematomyidium</i>	<i>C. ginesi</i> *	Tiputini, Cofán-Dureno (CD)
	<i>C. glabrior</i>	Tiputini, CD
	<i>C. neoparaensis</i> *	Tiputini
	<i>C. paraensis</i> *	Tiputini, CD
	<i>C. youngi</i> ‡	Pacto
<i>Hoffmania</i>	<i>C. diabolicus</i> *	Pacto, Tiputini
	<i>C. foxi</i> *‡	Tiputini
	<i>C. heliconiae</i>	Pacto, Tiputini
	<i>C. insignis</i> *‡	Pacto, CD
	<i>C. hylas</i>	Pacto, Tiputini, CD
	<i>C. guttatus</i>	Tiputini
	<i>C. pseudoheliconiae</i> ‡	Pacto, Tiputini
	<i>C. verecundus</i>	Pacto
<i>Mataemyia</i>	<i>C. bricenoi</i>	Tiputini
<i>Psychophaena</i>	<i>C. venezuelensis</i>	Urkisiki, CD
<b>Grupos de especie</b>		
Grupo <i>acotylus</i>	<i>C. acotylus</i> *‡	Tiputini
Grupo <i>carpenteri</i>	<i>C. camposi</i>	Tiputini
	<i>C. belemensis</i> *‡	Tiputini
Grupo <i>eublepharus</i>	<i>C. eublepharus</i>	Tiputini
Grupo <i>fluvialis</i>	<i>C. castillae</i> *	Tiputini
	<i>C. fluvialis</i> ‡	Tiputini
	<i>C. leopoldoi</i>	Tiputini
	<i>C. tetrathyris</i>	Tiputini
Grupo <i>leoni</i>	<i>C. leoni</i>	Tiputini
Grupo <i>limai</i>	<i>C. carvalhoi</i> ‡	Tiputini
	<i>C. limai</i>	Tiputini
	<i>C. lopesi</i> ‡	Tiputini
	<i>C. vernoni</i> ‡	Pacto
Grupo <i>pachymerus</i>	<i>C. pachymerus</i> *‡	Tiputini
Grupo <i>reticulatus</i>	<i>C. lyrinotatus</i> ‡	Tiputini
	<i>C. pauscienfuscatu</i> s‡	Tiputini
	<i>C. pifanoi</i> *‡	Tiputini
	<i>C. reticulatus</i> *‡	Tiputini
Grupo <i>stigmalis</i>	<i>C. deanei</i> *‡	Tiputini

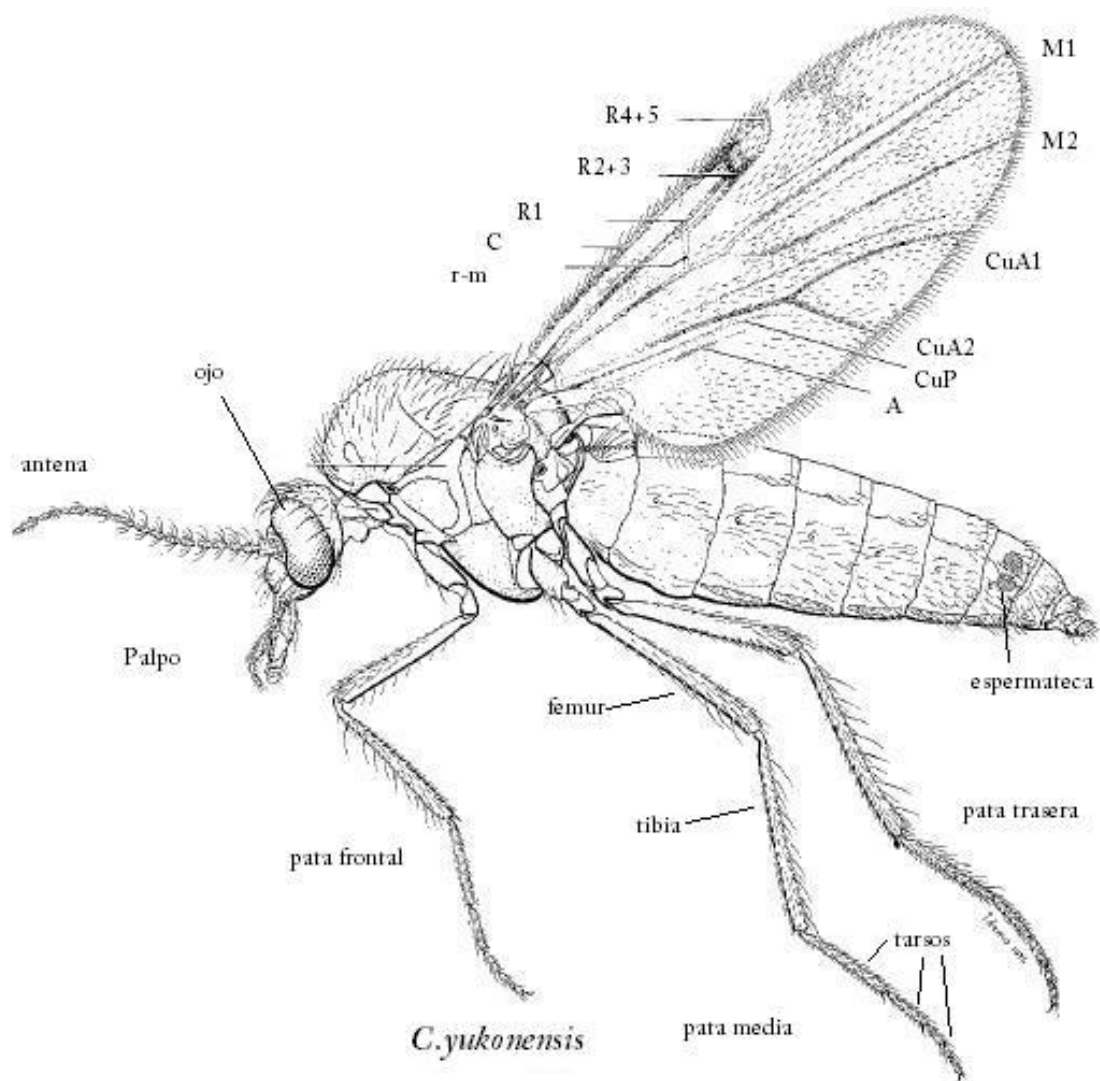
\*Especies antropofílicas, ‡ Especies que se reportan por primera vez en el Ecuador.

## 13. FIGURAS



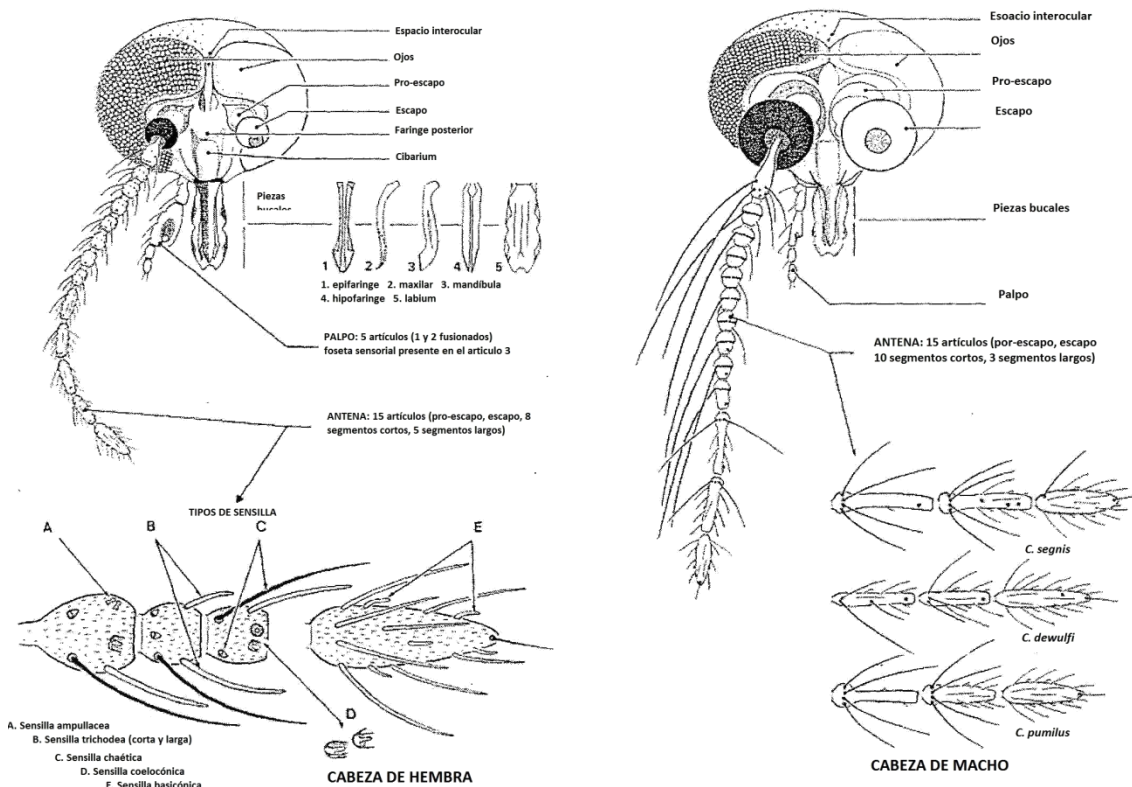
**Figura 1.-** Ciclo de vida de *Culicoides*.

œufs: huevos; larves st I., st. II, st. III y st. IV: larvas en estadio I, II, III y IV; nymphes: ninfa o pupa; y, adulte: adulto. Tomada de Mihn, 2010.



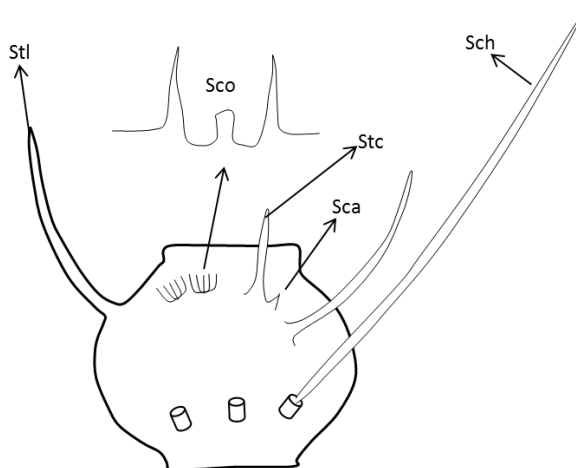
**Figura 2.-** Morfología de *Culicoides yukonensis* (hembra). Tomada y adaptada de McAlpine *et al.*, 1981.

Venas: r-m: radio medial, C: costal, R1: vena radial 1, R2+3: vena fusionada radial 2 y 3, R4+5: vena fusionada radial 4 y 5, M1: vena mediana 1, M2: vena mediana 2, CuA1: vena cubito-anal 1, CuA2: vena cubito-anal 2, CuP: vena cubito-postical, A: vena anal; venas nombradas en base Borkent & Spinelli, 2007 y McAlpine J.F. *et al.*, 1981.



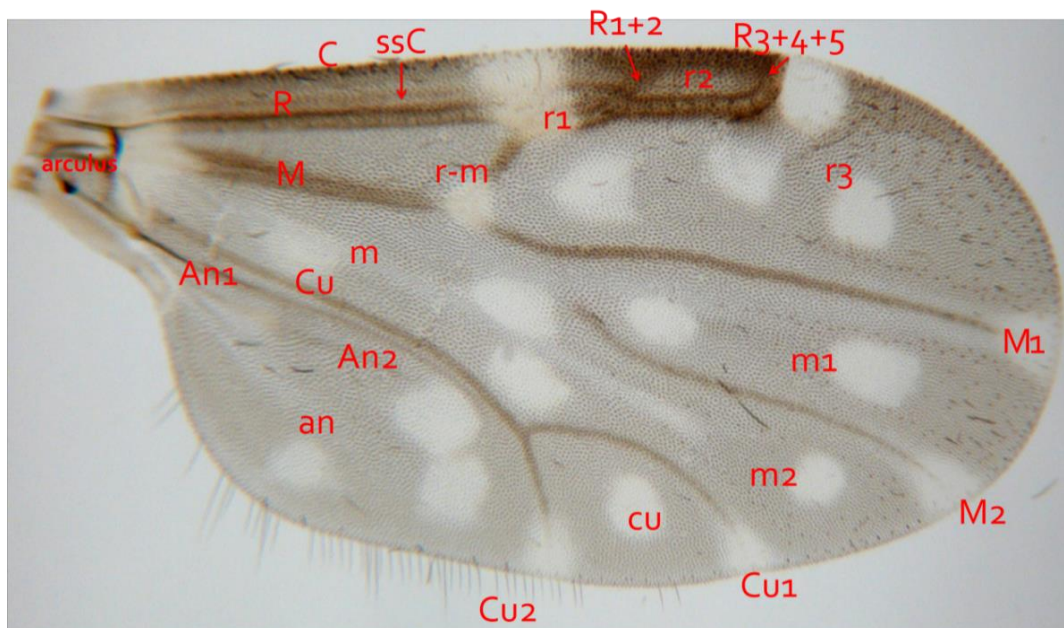
**Figura 3.-** Morfología de la cabeza de *Culicoides*.

Izquierda: cabeza de una hembra y derecha: cabeza de un macho. Tomado y adaptado de Mihn Hoan T., 2010.



**Figura 4.-** Ilustración de tipos de sensila presentes en los segmentos de antena.

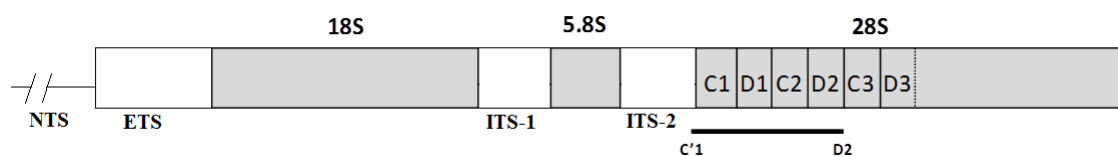
Stl: sensila tricodea larga, Stc: sensila tricodea corta, **Sco: sensila coelocónica**, Sca: sensila campaniforme, Sch: sensila caetica, Sb: sensila basicónica. Tomado y adaptado de Minh, 2010.



**Figura 5.-** Estructura del ala. *C. lyrinotatus*.

**Venas:** C: vena costal; ssC: vena subcostal; r-m; vena radio medial; R: vena radial principal; R1+2: vena radial fusionada 1 con 2; R3+4+5: vena radial fusionada 3 con 4 y 5; M: vena media principal; M1: vena media superior; M2: vena media inferior; Cu: vena cubital principal; Cu1 y Cu 2: venas cubitales 1 y 2; An1 y An2: venas anales 1 y 2.

**Celdas:** r1, r2 y r3: celdas radiales 1, 2 y 3; m, m1 y m2; celdas medias principal, 1 y 2; cu: celda cubital; y, an: celda anal. Fotografía: Moisés Gualapuro



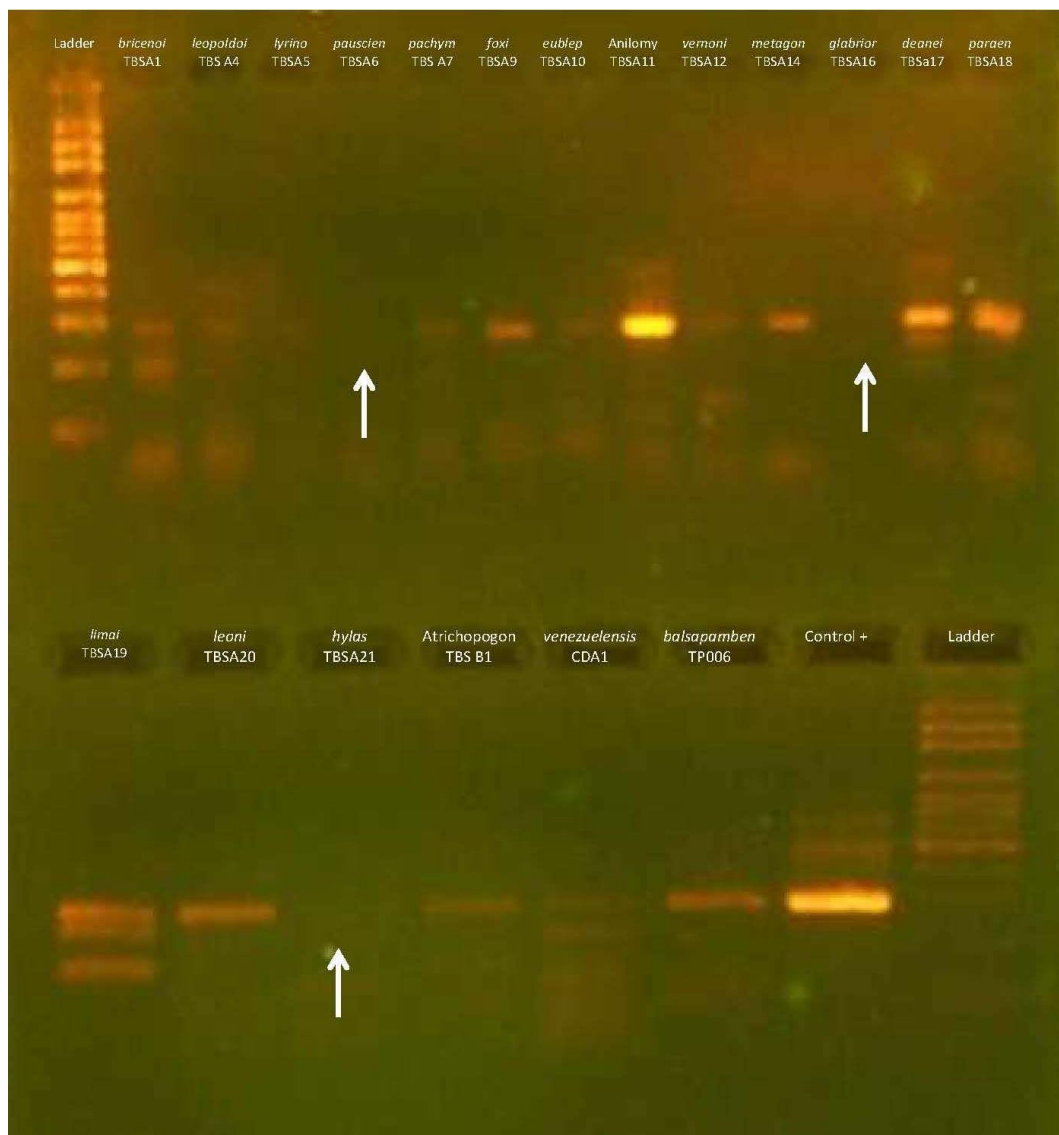
**Figura 6.-** Ilustración esquemática de las regiones conservadas (CX) y divergentes (DX) del ADN ribosomal de eucariotes.

NTS: Nontranscribed Space, ETS: External Transcribed Space, ITS: Internal Transcribed Space. Tomado y adaptado de Smolis, 2012.



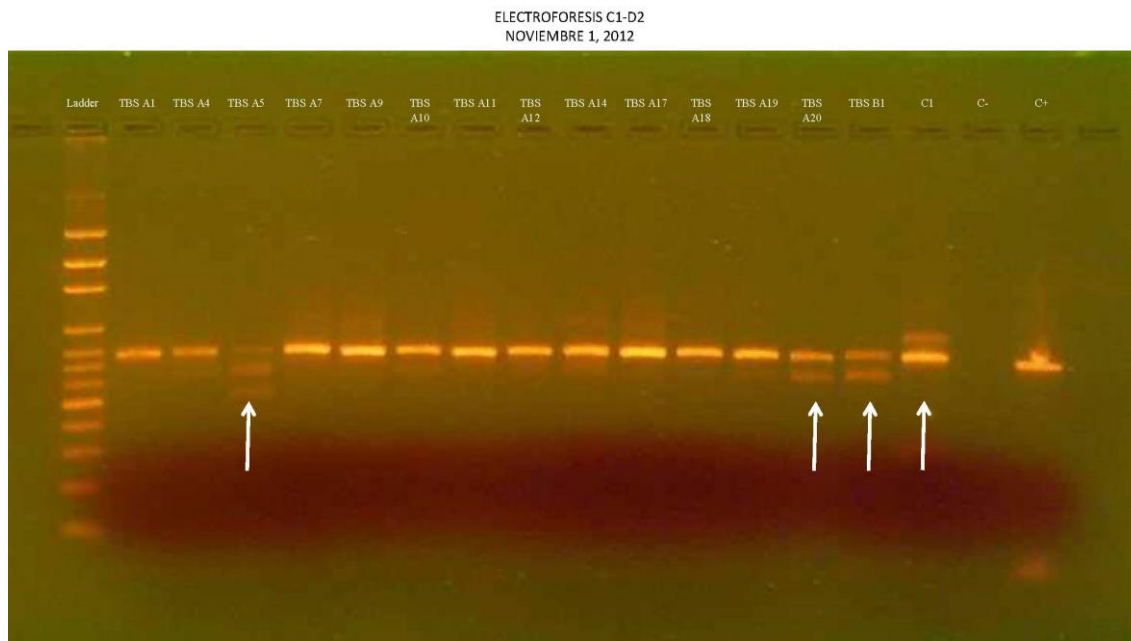
**Figura 7.-** Sitios de colección. 1 Urkusiki, 2 Pacto, 3 Comunidad Cofán-Dureno, 4 Estación de Biodiversidad Tiputini.  
Editado sobre Mapa Base Ecuador 1:500.000 (Instituto Geográfico Militar (IGM), 2012)





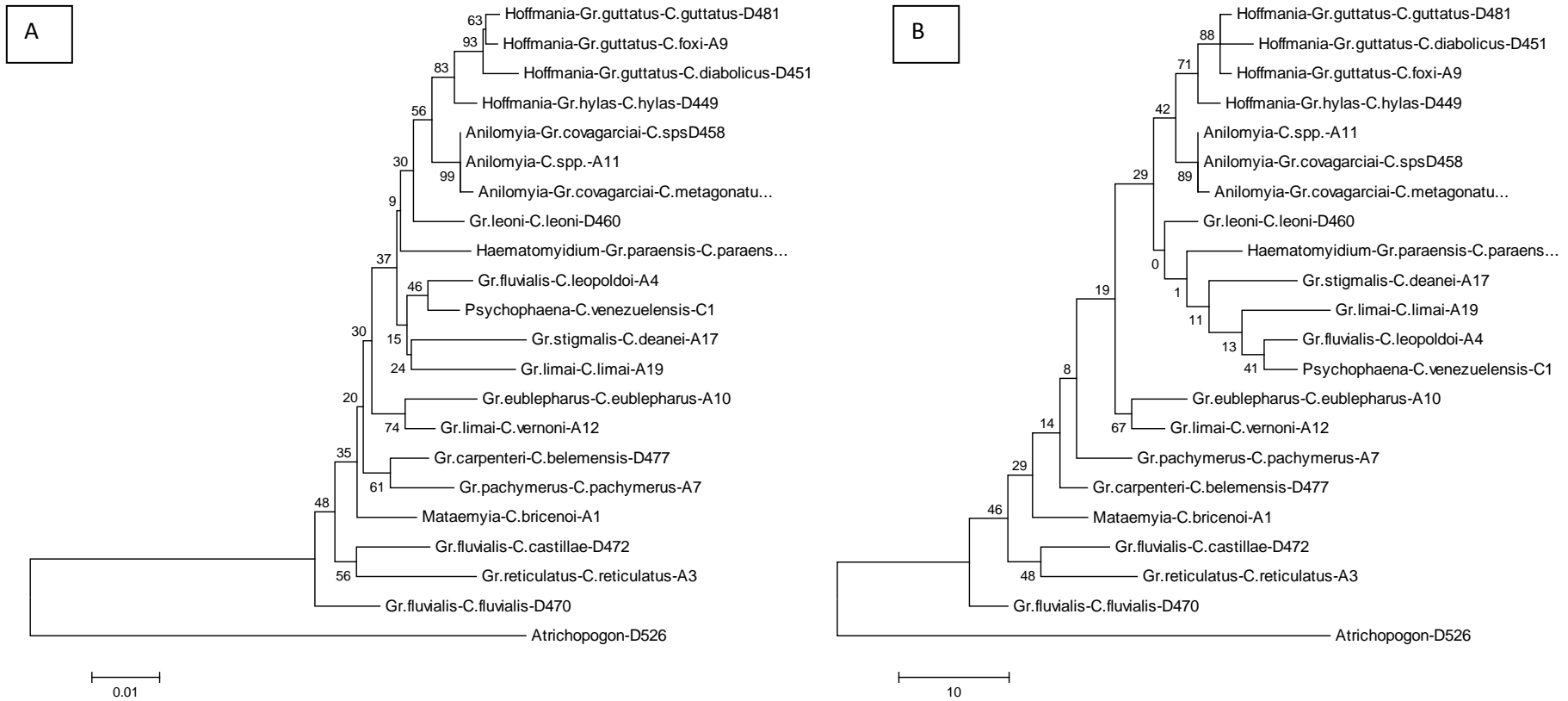
**Figura 8.-** Electroforesis de agarosa 1.5% y Bromuro de etidio 0.1% de la amplificación de Actina.

TBSA1.: *C. bricenoi*, TBSA4: *C. leopoldoi*, TBSA5: *C. lyrinotatus*, TBSA6: *C. pauscienfuscatus*, TBSA7: *C. pachymerus*, TBSA9: *C. foxi*, TBSA10: *C. eublepharus*, TBSA11: *C. sp.* (*Anilomyia*), TBSA12: *C. vernoni*, TBSA14: *C. metagonatus*, TBSA16: *C. glabrior*, TBSA17: *C. deanei*, TBSA18: *C. paraensis*, TBSA19: *C. limai*, TBSA20: *C. leoni*, TBSA5: *C. hylas*, TBSB1: *Atrichopogon sp.*, CDA1: *C. venezuelensis*, TP006: *C. balsapambensis*. Las flechas indican las muestras negativas



**Figura 9.-** Electroforesis de agarosa 1.5% y Bromuro de etidio 0.1% de la amplificación de la región C1-D2 de la subunidad 28S del ADNr.

TBSA1.: *C. bricenoi*, TBSA4: *C. leopoldoi*, TBSA5: *C. lyrinotatus*, TBSA7: *C. pachymerus*, TBSA9: *C. foxi*, TBSA10: *C. eublepharus*, TBSA11: *C. sp.* (*Anilomyia*), TBSA12: *C. vernoni*, TBSA14: *C. metagonatus*, TBSA17: *C. deanei*, TBSA18: *C. paraensis*, TBSA19: *C. limai*, TBSA20: *C. leoni*, TBSB1: *Atrichopogon sp.*, C1: *C. venezuelensis*. Las flechas indican las muestras que dieron amplificación inespecífica.



**Figura 10.-** Árboles obtenidos por el método de Neighbor joining (A) y Máximo de Parsimonia (B) de 22 especies de *Culicoides* y 1 especie de *Atrichopogon* como grupo externo.

## 14. ANEXOS

**Anexo 1.-** Clave para adultos del género *Culicoides* y algunos de sus subgéneros. Adaptado de Downes J.A & Wirth W.W., 1981, Paginas: 396-419

### Clave para adultos del género *Culicoides* y algunos de sus subgéneros

1. Wing with crossvein r-m absent (Fig. 2), without macrotrichia. Female antenna with 11 or 12 flagellomeres (Figs. 2.4) ... **LEPTOCONOPINAE** (*Leptoconops* Skuse)  
 Wing with crossvein r-m present, usually with macrotrichia and microtrichia (Figs. 12, 13). Female antenna with 13 flagellomeres (Figs. 11, 13, 15)..... **2**
2. Empodia well-developed, at least in female (Figs. 11, 65, 66); claws strongly curved (Figs. 65, 66). Wing usually with numerous macrotrichia (Fig. 11).....  
 ..... **FORCIPOMYIINAE** (*Forcipomyia* Meigen)  
 Empodia small or vestigial (Figs. 67, 68); claws more gently curved (Figs. 67, 68).  
 Wing usually with macrotrichia less numerous or absent..... **3**
3. Flagellomeres sculptured (Figs. 63, 64). Cell r1 nearly or completely closed; cell r2+3, square ended, usually ending at or before middle of wing, sometimes closed (Fig. 19).  
 Eye with short pubescence. Female claws small and equal (Fig. 67)...  
 ..... **DASYHELEINAE** (*Dasyhelea* Kieffer)  
 Flagellomeres not sculptured. Either cell r1 or cell r2+3 or both well-developed (except in *Rhynchohetea* and *Brachypogon*); cell r2+3 not markedly square-ended, ending beyond middle of wing (except in *Paradasyhelea*). Eye usually bare. Female claws various..... **CERATOPOGONINAE**.... **4**
4. M usually forking beyond crossvein r-m, i.e. medial fork petiolate (Figs. 12, 13, 24), although in *Echinohelea*. with spinose legs, M forking just at crossvein (Fig. 28); M, sometimes obsolescent basally (Fig. 24)..... **5**  
 M forking at or before crossvein r-m, i.e. medial fork sessile; M, nearly always complete (Figs. 14, 15, 37, 40)..... **Other Tribes**
5. Claws of both sexes small, equal, and simple (Figs. 12, 13). Wing with macrotrichia usually abundant; cell r1 and cell r2+3, both usually well-developed, similar in size. Prescutal pits prominent (Figs. 12, 13). Empodia small..... **Tribe Culicoidini** ... **6**  
 Claws of female usually larger, equal or unequal (Figs. 68-74); those of male smaller and equal. Wing with macrotrichia usually less numerous (Fig. 30), occasionally absent (Fig. 27); cell r1, and more rarely cell r2+3, also, sometimes closed or lost; cell r2+3, usually distinctly larger than cell r1 crossvein r-m nearly perpendicular to R4+5. Prescutal pits small or absent. Empodia small or absent.....  
 ..... **Tribe Ceratopogonini**
6. Cells r1 and r2+3 usually well-formed; C usually extending past middle of wing; wing commonly adorned with pale or dark spots (Figs. 1, 12, 13). Palpus five-segmented; female mouthparts usually fitted for bloodsucking, with mandible toothed..... **genus Culicoides** Latreille... **7**

- Cells r1 and r2+3 obliterated; C short, not reaching to middle of wing; wing without pale or dark spots (Fig. 20). Palpus three or four-segmented (Fig. 48); mouthparts reduced; female mandible not toothed..... **genus *Paradasyhelea* Macfie**
7. Spermathecae unsclerotized (Fig. 128). Parameres broadly fused, small (Figs. 102, 103). Wing without pattern of light and dark spots..... ***Culicoides* (*Seffia* Khalaf)**  
Spermathecae sclerotized. Parameres fused basally or separate. Wing usually with conspicuous pattern of light and dark spots..... **8**
8. One well-developed spermatheca. Parameres fused or separate..... **9**  
Two well-developed spermathecae (Fig. 127). Parameres separate..... **10**
9. Spermatheca elongate to U-shaped with large opening to duct (Fig. 126). Female without sensoria on flagellomeres 9-13. Parameres fused basally.....  
..... ***Culicoides* (*Monoculicoides* Khalaf)**  
Spermatheca elliptical with narrow opening to duct. Female with sensoria present on some of flagellomeres 9-13. Parameres separate (Figs. 104, 105).....  
..... ***Culicoides* (*Beltranmyia* Vargas)**
10. Cell r2+3 dark to apex (Fig. 22), rarely pale at extreme apex. Wing frequently with pattern of light and dark spots; wing macrotrichia of female fairly numerous. Segment 3 of palpus with variously shaped sensory pit (as in Fig.51). Paramere variously shaped, sometimes with fringing bristles apically (Figs. 106, 107).....  
***Culicoides* (*Callotia* Vargas & Kremer, *Diphaomyia* Vargas, *Haematomyidium* Goeldi, *Oeacta* Poey, *Wirthomyia* Vargas)**  
Distal portion of cell r2+3 in a pale area (Fig. 21). Wing, palpus, and parameres various..... **11**
11. Segment 3 of female palpus swollen to apex, with small round deep sensory pit (Fig. 50). Wing macrotrichia scanty; cell r2+3 short and broad.....  
***Culicoides* (*Avaritia* Fox)**  
Segment 3 of female palpus tapering beyond sensory area; sensilla usually scattered, rarely in a definite pit (Fig. 49). Wing macrotrichia usually more numerous; cell r2+3 narrower (Figs. 12, 13, 21)..... **12**
12. Wing with base of cell cua1 and adjacent veins pale (Fig. 21)... ***Culicoides* (*Hoffmania* Fox)**  
Wing with base of cell cua1 and adjacent veins in a dark area (Figs. 12, 13).....  
..... ***Culicoides* (*Culicoides* Latreille)**

**Anexo 2.-** Reacción de PCR para C1-D2

Reactivo	Cantidad por Reacción
H <sub>2</sub> O	23.75 µl
Buffer 5X	10 µl
MgCl <sub>2</sub> 25mM	4 µl
C1 50mM	1 µl
D2 50mM	1 µl
dNTPs 2mM	5 µl
Taq polimerasa 1.5U	0.25 µl
ADN	5 µl
<b>Total</b>	<b>20 µl</b>

**Anexo 3.-** Reacción de PCR para β-actina

Reactivo	Cantidad por Reacción
H <sub>2</sub> O	4.5 µl
Buffer 5X	4 µl
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1.4 µl
Primer Forward	2 µl
Primer Reverse	2 µl
dNTPs 0.5mM	2 µl
Taq polimerasa 1.5U	0.1 µl
ADN	4 µl
<b>Total</b>	<b>20 µl</b>

