

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Identificación molecular de las preferencias tróficas de género *Culicoides*
en cinco provincias del Ecuador**

Andrea Sofía Torres Moscoso

Sonia Zapata, Ph.D., Directora de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniera en
Procesos Biotecnológicos

Quito, agosto de 2014

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Identificación molecular de las preferencias tróficas del Género
Culicoides en cinco provincias del Ecuador**

Andrea Sofía Torres Moscoso

Sonia Zapata Mena, Ph.D.

Directora de Tesis

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Gabriel Trueba, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D.

Decana del Colegio de Ciencias

Biológicas y Ambientales

Quito, agosto de 2014

© 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: Andrea Sofía Torres Moscoso

C. I.: 1716637846

Fecha: Quito, agosto de 2014

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, hermanas y abuelos por su apoyo y amor diario.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial a Sonia Zapata por su paciencia y apoyo constante en el desarrollo de mi tesis y mi carrera también a Gabriel Trueba por sus consejos.

A María de Lourdes Torres por su labor con biotecnología, por compartir sus conocimientos y enseñarnos a ser mejores cada día.

A Stella de la Torre, Venancio Arahana, Renato León, Valeria Almeida, Vlastimil Zak, Pablo Riera, Diego Cisneros y todos mis profesores de la USFQ que siempre respondieron mis preguntas y me prepararon bien para ejercer mi profesión.

A Rosita Bayas, Lorena Mejía y Moises Gualapuro por ayudarme y enseñarme con paciencia lo necesario para el desarrollo de mi tesis.

A Denis Augot por venir de tan lejos y fortalecer los resultados de mi tesis.

A mis primos, tíos y amigos que tanto quiero y han estado siempre a mi lado.

Finalmente a Jorge Chiriboga por darme su amor y cariño y fuerzas para continuar hacia mis objetivos y hacerme tan feliz.

Resumen

El género *Culicoides* alberga especies de interés tanto médico como veterinario. Entre noviembre del 2012 y agosto del 2013 se realizó colectas entomológicas en 5 provincias del Ecuador (Pichincha, Esmeraldas, Manabí, Bolívar y Santo Domingo de los Tsáchilas). Se colectó 3,317 especímenes del género *Culicoides* y se separó a las hembras que tenían ingesta de sangre reciente (abdomen color rojo o café). Se identificó 18 especies: *C. batesi*, *C. carpenteri*, *C. castillae*, *C. diabolicus*, *C. filarifer*, *C. foxi*, *C. glabellus*, *C. guttatus*, *C. heliconiae*, *C. hylas*, *C. insignis*, *C. leopoldoi*, *C. limai*, *C. ocumarensis*, *C. pifanoi*, *C. pseudodiabolicus*, *C. pusillus* y *C. tetrathyris*. Para determinar la fuente de alimentación de los culicoides con ingesta de sangre reciente, se realizó un análisis de las secuencias del gen nuclear prepronociceptina (PNOC). Los animales vertebrados de los que se alimentaron los culicoides en este estudio corresponden a: *Bos Taurus* (48,84%), *Equus caballus* (39,53%) *Choloepus didactylus - hoffmani* (9,30%), y *Homo sapiens* (2,33%). Este estudio provee información importante acerca de las preferencias tróficas de la fauna del género *Culicoides* en 5 provincias del Ecuador. Además, constituye un aporte para entender el ciclo de vida de los culicoides, la posible transmisión de patógenos y el establecimiento de estrategias para programas de control en el caso del apareamiento de enfermedades como la Lengua Azul y Fiebre de Oropuche en el Ecuador. Las mismas que no han sido registradas en el país, pero han sido reportadas en países cercanos como Perú, Colombia, Brasil y Argentina.

Abstract

The genus *Culicoides* is involved in the transmission of important medical and veterinary diseases. From November 2012 to August 2013, 3,317 specimens were collected in 5 Ecuadorian provinces (Pichincha, Esmeraldas, Manabí, Bolívar and Santo Domingo de los Tsáchilas). Engorged female midges were isolated belonging to 18 species: *C. batesi*, *C. carpenteri*, *C. castillae*, *C. diabolicus*, *C. filarifer*, *C. foxi*, *C. glabellus*, *C. guttatus*, *C. heliconiae*, *C. hylas*, *C. insignis*, *C. leopoldoi*, *C. limai*, *C. ocumarensis*, *C. pifanoi*, *C. pseudodiabolicus*, *C. pusillus* and *C. tetrathyris*. Molecular blood meal identification of 43 specimens was carried out through amplification and sequencing of prepronociceptin (PNOC) gene. The results showed that midges fed on: *Bos Taurus* (48,84%), *Equus caballus* (39,53%) *Choloepus didactylus – hoffmani* (9,30%) and *Homo sapiens* (2,33%). This study provides important information about trophic preferences of *Culicoides* in 5 provinces of Ecuador. Also, it is a contribution to the understanding of their life cycles, potential pathogen transmission and design of control strategies in the case of emerging diseases such as Blue Tongue and Oropuche Fever in Ecuador. Although these diseases have not been registered in Ecuador there are reports in nearby countries such as Peru, Colombia, Brazil and Argentina.

Índice

Resumen	7
Abstract.....	8
1. Introducción	13
1.1. Generalidades	13
1.2. Reproducción y ciclo de vida de los culicoides	14
1.3. Los culicoides como vectores	16
1.4. Identificación de preferencias tróficas de los insectos.....	18
1.4.1 Técnicas de identificación de preferencias tróficas de insectos.....	19
1.4.2 Técnicas moleculares para identificar fuentes de sangre	19
1.4.3 Gen Prepronociceptina	21
1.4.4 Limitaciones de determinar la fuente de alimentación de insectos.....	23
2 Justificación.....	24
3 Objetivos	26
3.1 <i>Objetivo general</i>	26
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	26
4 Área de estudio.....	26
5 Materiales	27
5.1 Colección de dípteros.....	27
5.2 Separación de culicoides.....	27
5.3 Montaje en placa de especímenes del género <i>Culicoides</i> alimentados.....	28

5.4	Identificación de especies del género <i>Culicoides</i>	28
5.5	Extracción de ADN de especímenes del género <i>Culicoides</i>	28
5.6	Amplificación del gen PNOC	29
5.7	Análisis de secuencias del gen PNOC	30
6	Metodología	30
6.1	Colección de dípteros.....	30
6.2	Identificación morfológica del género <i>Culicoides</i>	31
6.3	Extracción de ADN.....	32
6.4	Amplificación del gen PNOC	33
6.5	Secuenciación y Análisis de secuencias del gen PNOC	34
7	Resultados	34
7.1	Colección entomológica de insectos.....	34
3.1	Identificación morfológica de subgéneros y especies del género <i>Culicoides</i>	35
3.2	Identificación molecular de las fuentes de alimentación del género <i>Culicoides</i> ..	36
4	Discusión.....	37
5	Conclusiones	44
6	Recomendaciones.....	45
7	Referencias bibliográficas	46
8	Tablas	58
9	Figuras.....	61
10	Anexos.....	67

Índice de Tablas

Tabla 1 Sitios de colección de dípteros	58
Tabla 2 Total de especímenes del género Culicoides con sus porcentajes.....	58
Tabla 3 Lista de especies del género Culicoides con ingesta de sangre colectados en 5 provincias del Ecuador	59
Tabla 4 Preferencias tróficas de las especies de Culicoides con respecto a los sitios de captura	60
Tabla 5 Preferencias tróficas de cada subgénero de Culicoides	60

Índice de Figuras

Figura 1 Ciclo de vida de las hembras del género Culicoides. Tomado de Logan, 2010.	61
Figura 2 Ubicación del gen PNOC en el cromosoma 8 humano. Tomado de Mollereau, 1996.	62
Figura 3 Organización general del gen PNOC. Tomado de Mollereau, 1996	62
Figura 4 Etapas de alimentación de los culicoides. Tomado de Barsch, 2009.....	63
Figura 5 Patrón de pigmentación del ala de los culicoides. Tomada de Gualapuro, 2012	63
Figura 6 Porcentaje de subgéneros y especies de hembras alimentadas recientemente del género Culicoides	64
Figura 7 Porcentaje de especies de las hembras culicoides con ingesta de sangre reciente	65
Figura 8 Electroforesis en gel de agarosa de amplificación del gen PNOC de 333 pares de bases; 1J-9J: Abdómenes de culicoides con ingesta de sangre reciente colectados en Santo Domingo de los Tsáchilas	65
Figura 9 Porcentaje de animales vertebrados de los que se alimentaron los culicoides hembras con ingesta de sangre reciente.....	66

1. Introducción

1.1. Generalidades

El género *Culicoides*, pertenece a la clase Insecta, orden Díptera y familia Ceratopogonidae (Clausen et al., 2009). Los individuos pertenecientes a este género miden de 1 a 3 milímetros de largo, tienen un cuerpo de color negro o café, alas con patrones de pigmentación claros y oscuros, ojos grandes, cabeza pequeña, antenas con 14 a 15 segmentos y en hembras el número de espermatecas difiere dependiendo de la especie (Ortiz & León, 1955; Boorman, 1993).

La mayoría de hembras son hematófagas es decir, necesitan alimentarse de sangre para la maduración de los huevos, el insecto concentra la sangre por una diuresis rápida (Magnarelli, 1981; Boorman, 1993). Los machos y algunas hembras obtienen energía de carbohidratos del néctar de flores y plantas como banano, caucho y cacao para volar (Boorman, 1993; Borkent & Spinelli, 2007). La adquisición y uso de azúcares simples son importantes para llevar a cabo todos los procesos de la vida del insecto (Magnarelli, 1981; Boorman, 1993).

Las hembras se alimentan de sangre de mamíferos, aves o insectos por lo que presentan un aparato bucal con órganos de succión y perforación bien desarrollados (Downes, 1978; Boorman, 1993; Mellor et al., 2000; Mullens et al., 2004).

El volumen de sangre ingerida es de aproximadamente de 10^{-4} mL y 10^{-5} mL, a diferencia de otros dípteros como los flebótomos (5×10^{-4} a 1×10^{-3} mL) y de los leptoconops (2×10^{-4} mL) (Boorman, 1993; Borkent & Spinelli, 2007).

La longevidad de los culicoides no ha sido determinada con precisión, pero se sugiere que pueden vivir de 2 semanas a algunos meses; mientras más tiempo de vida, la alimentación se vuelve más recurrente, lo que aumenta la posibilidad de transmitir patógenos (Mehlhorn, 2008).

Se conocen más de 1,400 especies en una gran variedad de hábitats, desde el nivel del mar hasta ambientes montañosos con alturas mayores a 4,000 metros y desde el trópico hasta regiones árticas y sub árticas (Mehlhorn, 2000).

Se encuentran en casi todas las partes del mundo menos en las regiones polares y algunas islas, puesto que para su desarrollo requiere condiciones húmedas y cálidas (Boorman, 1993). El incremento del transporte, comercio y el cambio climático juegan un rol importante en la introducción, establecimiento y propagación de patógenos transmitidos por estos dípteros. Un ejemplo de esto fue la introducción del virus de la lengua azul de serotipo 8 en Benelux, Alemania, y Francia en el 2006 (Lassen, 2012).

1.2. Reproducción y ciclo de vida de los culicoides

El apareamiento ocurre generalmente durante el vuelo, en ocasiones algunas especies secretan feromonas por los poros del abdomen (Boorman, 1993). Poseen una metamorfosis completa: huevo, cuatro estadios larvales, pupa y adulto (Borkent & Spinelli, 2007) (Figura 1). Las hembras colocan de 30 a 200 huevos en forma de banana y con proyecciones que le permiten adherirse al lodo húmedo ya que son incapaces de resistir la desecación. El número de huevos que deposita la hembra depende tanto de la cantidad de

sangre con la que se alimente, así como de la disposición de nutrientes (hembras autógenas) (Mullen & Durden, 2009).

Los huevos requieren entre 7 a 10 días para su desarrollo, y entre 2 a 7 para su eclosión. Las larvas son delgadas de color blanquecino sin apéndices, parecidas a los nemátodos, tienen una cápsula esclerotizada en la cabeza y pueden ser acuáticas o semi acuáticas; se encuentran en una gran variedad de hábitats como compost, hojarasca, barro, márgenes de estanques, lagos, maleza flotante y lodo con desechos (Mullen & Durden, 2009).

El tiempo de vida larval varía dependiendo de la especie, sin embargo un factor común es la presencia de 4 estadios larvales, los cuales pueden abarcar periodos tan cortos como de dos semanas hasta periodos prolongados que superan el año. El estado de pupa generalmente ocurre en la superficie de sustratos húmedos, de tal manera que los apéndices protorácicos puedan estar en contacto con el agua. Esta es la razón por la cual las pupas generalmente se encuentran en barro o lodo (Mullen & Durden, 2009).

Una vez que se haya alcanzado la fase adulta, el tiempo de vida varía entre 2 a 7 semanas. Cada especie dispone de una abundancia característica de individuos adultos en determinadas estaciones del año, pero la mayoría generan 2 o más generaciones por año. Para cada puesta de huevos, las hembras requieren alimentarse de sangre, de tal manera que puedan adquirir los nutrientes necesarios para el desarrollo de sus huevos; es en este evento en el cual la hembra (vector), puede infectar o ser infectado de algún patógeno (Mullen & Durden, 2009).

El vuelo es limitado, pero pueden movilizarse por largas distancias con la ayuda del viento (Carn, 1996; Hendrickx et al., 2006). Pueden ser llevados por el viento del área en donde se alimentaron hacia el lugar donde realizan la digestión. Se ha encontrado culicoides alimentados de sangre de vertebrados que se encontraban a 1.5 kilómetros de la localidad

de colección (Lassen et al., 2012). Algunas especies se dispersan hasta 3 km en 24 horas sin la ayuda del viento. Estudios realizados en brotes de la enfermedad del caballo africano, han reportado que los culicoides pueden recorrer 700 km en 20 horas a 20°C. Otras investigaciones que se hicieron en la propagación del virus de la Lengua Azul y la enfermedad Epizootica Hemorrágica demuestran una dispersión de 110 km en 8.5 horas a 12°C (Boorman, 1993). El virus de la lengua azul y el virus de Akabane pueden haberse extendido desde Chipre hacia al oeste de Turquía, desde Siria hasta el este de Turquía y desde Cuba hasta Florida a través de los culicoides (Sellers & Pedgley, 1985; Sellers & Maarouf, 1989; Boorman, 1993).

1.3. Los culicoides como vectores

Son vectores de parásitos y virus. Tres factores afectan la eficacia vectorial: el volumen de sangre en el interior del abdomen del espécimen, la frecuencia de alimentación y la supervivencia del insecto en el campo (Boorman, 1993). Debido al tamaño de los culicoides, los volúmenes de sangre que ingieren son pequeños, lo que implican una baja tasa de infección, ya que existe menor oportunidad de ingerir suficiente virus como para infectar al insecto. Por ejemplo el pico común de viremia de lengua azul en las ovejas infectadas es de 10^4 a 10^5 unidades infecciosas por mL de sangre y los culicoides pueden ingerir de 10^{-4} mL a 10^{-5} mL de sangre (Boorman, 1993; Bartsch et al., 2009).

Los culicoides tienen la capacidad de transmitir hematozoarios a lagartos y aves, filarias a humanos y caballos, orthobunyaviruses a humanos y rumiantes y orbiviruses a caballos y rumiantes. Generalmente estas enfermedades fueron asociadas con los subtrópicos pero han sido accidentalmente introducidas en Europa por migración de vectores y el transporte de animales infectados (Lowrie & Raccurt, 1981; Linley, 1985; Mellor et al, 2000; Garvin & Greiner, 2003; Takken et al., 2008; Ninio et al., 2010; Kupferschmidt, 2012).

Varias enfermedades severas y de gran impacto económico, han sido provocadas por virus transmitidos por estos dípteros, tales como: Fiebre Catarral Ovina (Lengua Azul), Enfermedad del Caballo Africano, Fiebre Efemeral Bovina y el Virus de Akabane (Boorman, 1993; Sarto & Saiz, 2003; Walton, 2004; Mullens et al, 2004; Bartsch et al., 2009; Ninio et al, 2010; Logan, 2010).

Los principales vectores del virus de la Lengua Azul en el nuevo mundo son *Culicoides variipenis*, *C. sonorensis* y *C. insignis*; en el mediterráneo y el medio oriente son *C. imicola* y *C. obsoletus*; en Africa *C. imicola*, *C. milnei* y grupos de *C. schultzei* particularmente *C. oxystoma*; en Asia y Australasia las especies del subgénero *Avaritia*, principalmente *C. imicola*, *C. brevitarsis*, *C. actoni*, *C. wadai* y *C. fulvus* (Barber & Jochim, 1985; Boorman, 1993; Walton, 2004; Bartsch et al., 2009; Ninio et al, 2010). El virus de la Lengua Azul está presente en los Estados Unidos, Canadá, el Caribe, América del Sur, África tropical y del Sur, España, Portugal, Islas Griegas, Turquía, Medio Oriente, India, Asia y Australasia (Barber & Jochim, 1985; Taylor, 1987; Boorman, 1993; Walton, 2004; Bartsch et al., 2009; Ninio et al, 2010). Por otro lado, *C. imicola* es el vector de la Enfermedad de Caballo Africano (Boorman, 1993; Walton, 2004).

De lo que se conoce hasta ahora, solamente el virus del Oropuche causa enfermedad en humanos, el principal vector es *C. paraensis* que se ha encontrado principalmente en América del Sur (Boorman, 1993; Lager, 2004, Bartsch et al., 2009).

Los principales vectores de *Mansonella perstans* son las especies: *C. milnei*, *C. grahamii* y *C. inornatipennis* que se encuentran en el oeste y centro de África, América del Sur, México, Estados Unidos, Trinidad y el área del Caribe (Boorman, 1993). En América del Sur y el Caribe se encuentra *M. ozzardi* con tasas de infección de hasta el 96% y es transmitida principalmente por *C. furens* y *C. phlebotomus*, los vectores en Colombia son *C. insinuatus* (Tidwell & Tidwell, 1982; Boorman, 1993; Bartsch et al., 2009).

La Enfermedad Hemorrágica Epizootica que afecta a los venados, es transmitida por *C. variipennis*, *C. oxystoma* y *C. brevitari* en los Estados Unidos (Boorman, 1993; Bartsch et al., 2009).

El control vectorial se basa en el uso de repelentes y una amplia gama de insecticidas, que afectan a los adultos y estadios larvarios del insecto. En brotes de enfermedades se ha realizado tratamiento a los animales afectados con permetrina o ivermectina (Boorman, 1993).

En el Ecuador se han reportado 65 especies del género *Culicoides*, 16 fueron registradas recientemente. El subgénero *Hoffmania* es considerado como el más prevalente en el país. Además, se han identificado algunas especies antropofílicas: *C. ginesi*, *C. neoparaensis*, *C. paraensis*, *C. diabolicus*, *C. castillae*, *C. foxi*, *C. insignis*, *C. acotylus*, *C. belemensis*, *C. pachymerus*, *C. pifanoi*, *C. reticulatus*, *C. deanei* (Ortiz & León, 1955; Dillon & Lane, 1993; Borkent & Spinelli, 2007; Gualapuro & Zapata, 2013).

1.4. Identificación de preferencias tróficas de los insectos

Para determinar el origen de alimentación de dípteros, se ha usado una variedad de métodos y técnicas, las cuales varían considerablemente en su habilidad de identificar a la fuente de sangre a nivel de especie (Haouas et al., 2007).

En la mayoría de estudios, se han usado insectos implicados en la transmisión de parásitos y virus pertenecientes a las familias: Culicoidae, Glossinidae y Psychodidae (Haouas et al., 2007).

1.4.1 Técnicas de identificación de preferencias tróficas de insectos

Entre las técnicas más utilizadas están: pruebas de precipitinas, pruebas de difusión en gel y ELISA (Braverman et al., 1971; Walker & Davie, 1971; Nevill & Anderson, 1972; Haouas et al, 2007). Sin embargo presentan limitaciones técnicas como la posibilidad de una reactividad cruzada entre especies, el requerimiento de producir anticuerpos específicos para una gran cantidad de hospederos potenciales y la dificultad en descubrir reservorios no predecibles. Los métodos de ELISA en general son procesos complicados y laboriosos que requieren pasos de pre absorción para eliminar reacciones cruzadas y la preparación de suero hiper inmune para detectar sangre de las posibles fuentes (Braverman et al., 1971; Walker & David, 1971; Nevill & Anderson, 1972; Haouas et al 2007). Estudios de culicoides realizados con ELISA pudieron conocer la fuente de sangre del 71.5% de especímenes muestreados, en donde encontraron que los bovinos son la fuente de alimentación más común, seguida por ciervos y ovejas, solo un espécimen se alimentó de humanos (Blackwell et al., 1994).

Algunos estudios de preferencias tróficas usan pruebas de precipitinas y tienen éxito, tal es el caso de la investigación realizada en Kenia con 682 especímenes, donde se obtuvo una efectividad del 85%. En el trabajo de Tempelis y Nelson (1971) estudiaron a *C. varipennis* e identificaron la fuente de sangre del 79.5% de especímenes, proveniente de mamíferos, lepóridos y bovinos. También Braverman y colaboradores en 1971 pudieron identificar la fuente de sangre del 55.8% de culicoides de la especie *C. pallidipennis*.

1.4.2 Técnicas moleculares para identificar fuentes de sangre

Las técnicas moleculares han incrementado significativamente la eficacia y fiabilidad de la identificación de la fuente de sangre de insectos vectores con un alto grado de sensibilidad

y especificidad (Haouas et al., 2007; Ninio et al., 2010). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es la técnica más usada para determinar la fuente de alimentación de los culicoides, entre las propuestas que se disponen con esta técnica se han amplificado minisatélites, microsátélites, genes mitocondriales y nucleares (Mukabana et al., 2002).

La PCR heteroduplex con amplificación dependiente de helicasa (PCR-ADH) es una técnica exitosa para determinar varias fuentes de sangre del abdomen de un insecto, se obtienen productos de PCR mezclados, que presentan un complejo patrón de una o varias bandas (Lee et al., 2002; García et al., 2011). Sin embargo, el PCR ADH tiene la desventaja de tener un número limitado de patrones de referencia para el análisis y la necesidad de una buena interpretación visual de los geles (Boakye et al., 1999; Lee et al., 2002; Njiokou et al., 2004).

Los marcadores que originalmente fueron diseñados para estudios de relaciones filogenéticas entre vertebrados han sido usados para determinar el origen de alimentación de los artrópodos hematófagos, como es el caso del gen mitocondrial del citocromo B y el gen nuclear prepronociceptín (PNOC), existe gran cantidad de información de las secuencias de varios vertebrados de estos genes (Ninio et al., 2010). La mayoría de estudios sobre preferencias tróficas están basados en el análisis del gen mitocondrial del citocromo B (cytb) que se encuentra en numerosas copias en cada célula (Lee et al, 2002; Kent & Norris, 2005; Haouas et al., 2007; Townzen et al., 2008; Ninio et al., 2010).

El gen del citocromo B es una de las regiones mejor conservadas del genoma mitocondrial (Lee et al., 2002). Las secuencias de este gen tiene suficientes polimorfismos inter específicos, que ayudan a determinar primers específicos para distintas especies y permiten definir el género y especie del animal del cual se alimentó el insecto (Hebert et al., 2003; Maleki et al., 2009; Lassen et al., 2012).

Estudios que han usado el gen del citocromo B, han obtenido una co-amplificación de ADN de vertebrados con ADN de *Anopheles* (Townzen et al., 2008), por lo cual varios científicos han elegido utilizar otro marcador como es el gen nuclear prepronociceptina (PNOC) el mismo que ha sido usado en estudios filogenéticos de mamíferos (Murphy et al., 2001; Haouas et al., 2007).

Por ser genes conservados y evidenciar polimorfismos que permiten diferenciar entre especies, también se ha usado ADN ribosomal 18S, la región hipervariable 2 del ADN mitocondrial, TC-11 y VWA locis, citocromo oxidasa I (HUMVWFA31/A), gen del citocromo c oxidasa I (COI) y barcodes de ADN (Hebert et al., 2003; Maleki et al., 2009; Lassen et al., 2012).

Los animales vertebrados que comúnmente se han identificado como fuente de alimentación de los culicoides han sido *Bos taurus*, *Capra hircus*, *Capreolus capreolus*, *Cervus elaphus*, *Equus caballus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Ovis arie*. Algunas especies se han alimentado de reptiles, sapos y conejos (Tempelis et al., 2009; García et al., 2011).

1.4.3 Gen Prepronociceptina

El gen prepronociceptina (PNOC) está altamente conservado en ratones, ratas y humanos, tiene características de organización muy similares a los genes de preproencefalina, preprodinorfina y prepropiomelanocortina, precursores de péptidos opioides endógenos. Estos 4 genes pertenecen a la misma familia y tienen un origen evolutivo común (Mollereau et al., 1996).

Se ha demostrado que el gen PNOC codifica una copia única de nociceptina, así como otros péptidos con una secuencia estrictamente conservada entre especies murinas y en humanos (Mollereau et al., 1996).

Este gen es muy importante en la neurofisiología y es transcrito de forma predominante en el sistema nervioso central (cerebro y médula espinal) y débilmente en los ovarios, el único órgano periférico que expresa este gen (Mollereau et al., 1996).

Mediante el uso de un panel de radiación de línea celular híbrida, se mapeó al gen PNOC, en el brazo corto del cromosoma humano 8 (8p21), entre los marcadores (WI-5833) y (WI-1172), en una proximidad muy cercana al locus que codifica a la cadena ligera del neurofilamento (NEFL) (Mollereau et al., 1996) (Figura 2).

El gen PNOC, es un precursor que codifica al menos tres péptidos biológicos activos, que son nocistatin, nociceptin y nocII/III, debido a que es predominantemente transcrito en el cerebro y la médula espinal, se lo ha usado en estudios de asociaciones genéticas con esquizofrenia ya que el patrón de expresión y la gran variedad de funciones de este gen ha hecho que sea un candidato atractivo para aumentar la susceptibilidad a la esquizofrenia (Blaveri et al., 2001).

Por otro lado, este marcador es un gen nuclear de copia única que ha tenido éxito en la determinación del origen de la sangre de la cual se alimentaron insectos vectores (Haouas et al., 2007; Ninio et al., 2010). Estas características del gen PNOC permiten una identificación específica de la fuente de sangre en el 100% de casos por secuenciación directa y comparación de las secuencias resultantes con más de 64 especies de mamíferos que están publicados en el Gen Bank (Ninio et al., 2010). Este gen ha sido usado satisfactoriamente en estudios de patrones de alimentación de garrapatas (Kirstein & Gray, 1996) y mosquitos (Mollereau et al., 1996; Murphy et al., 2001; Lee et al., 2002; Kent & Norris, 2005) (Figura 3).

1.4.4 Limitaciones de determinar la fuente de alimentación de insectos

La degradación de ADN de la sangre, resultante de varios procesos digestivos de los artrópodos hematófagos es el factor más influyente en la sensibilidad de la PCR (Wolfgang et al., 2002). Esta actividad enzimática está asociada con nucleasas (DNasas), lo que explica la rapidez con la que declina la cantidad de ADN, después de las primeras 24 horas de la alimentación (Haouas et al., 2007) (Figura 4).

En flebótomos existe un pico de la actividad de la proteasa, entre las horas 24 y 48 después de la alimentación (Dillon & Lane, 1993). Este pico difiere y depende de varios factores como especie, fisiología digestiva y el tipo de vertebrado del cual se alimentó (Kirstein & Gray, 1996; Boakye et al., 1999; Ngo & Kramer, 2003; Kent & Norris, 2005).

El porcentaje de amplificación del gen PNOC indica un decrecimiento relacionado con la digestión progresiva de la sangre (Haouas et al., 2007). El color de la sangre en el abdomen del insecto puede dar información sobre el estado de digestión de la misma (Svobodova et al., 2003). En flebótomos se realizó una clasificación de 3 niveles de digestión y se ha evaluado la sensibilidad de la reacción a diferentes tiempos de degradación, donde no hubo amplificación del gen PNOC cuando se analizó la sangre después de 37 a 48 horas de la alimentación. El porcentaje de identificación de la fuente de sangre varía del 100%, 86% al 66% con los niveles de digestión de 1, 2 y 3 respectivamente. En promedio el 79% de especímenes alimentados con sangre mostraron resultados positivos en los ensayos de PCR (Haouas et al., 2007).

Esta clasificación de niveles de digestión, no aplica para los culicoides debido a que el cuerpo de los mismos es de color oscuro y varía en la pigmentación dependiendo de la especie (Ninio et al., 2010). Algunos estudios han determinado que varias especies de adultos, que ya han puesto huevos al menos una vez, se distinguen por desarrollar un

pigmento rojo y oscuro en la las capas de la epidermis y subepidermis del abdomen (Dyce, 1969; Boorman, 1993).

Por otro lado, estudios con *Anopheles gambiae* han demostrado una tasa de digestión de sangre dependiente de la temperatura, cuando la misma aumenta, se acelera la digestión de sangre y se reduce la sensibilidad de detección de la fuente de sangre (Afrane et al., 2005). La digestión de sangre es más rápida en los trópicos que en los climas templados, donde las temperaturas son menores (Lee et al., 2002). Adicionalmente investigaciones han demostrado que la infección con parásitos como la *Leishmania* puede decrecer la actividad enzimática y puede mejorar la detección de la fuente de sangre por periodos más largos (Daba et al., 2004).

Los dípteros del género *Culicoides* se encuentran en una gran variedad de hábitats en casi todas las partes del mundo y las hembras necesitan de sangre para madurar sus huevos, características que contribuyen a su gran capacidad vectorial (Magnarelli, 1981; Boorman, 1993). A pesar de que los culicoides son vectores de patógenos, no existe suficiente información sobre la dinámica de transmisión y fuente de alimentación de los mismos. El estudio de las preferencias tróficas de los culicoides puede direccionar a conocer potenciales reservorios y especies que son importantes en la transmisión de enfermedades (Murray et al., 2009).

2 Justificación

Algunas especies del género *Culicoides* son vectores de virus y parásitos que afectan a humanos y animales. Las enfermedades en animales son de tal relevancia, que han sido identificadas en la lista A, por la Organización Mundial para la salud animal, las mismas que tienen la capacidad de propagarse rápidamente, no tienen fronteras y tienen

consecuencias tanto socio económicas como en la salud de las personas (Mellor et al., 2000; WHO, 2012).

Hasta el momento no existe ningún estudio sobre las preferencias tróficas de los culicoides en el Ecuador y en América Latina. En Ecuador no hay registros de enfermedades transmitidas por culicoides, sin embargo se ha detectado anticuerpos contra el virus de la Lengua Azul en ovejas y la presencia de respuesta inmune humoral contra el virus de Oropuche, en un estudio realizado en la provincia de Pastaza (Izurieta et al., 2009; Lager, 2004; Lopez et al., 1985).

Estos dípteros se encuentran en casi todo el mundo, menos en las zonas polares y la dispersión por vuelo de los mismos depende de condiciones ambientales (viento), que les ayuda a viajar largas distancias. Con el creciente aumento de la globalización y el transporte de animales vivos, se incrementa el riesgo de que especies vectoras se trasladen de un sitio a otro y por lo tanto puede darse una rápida propagación de patógenos (Bartsch et al., 2009).

Actualmente se dispone de información limitada sobre la dinámica de transmisión y preferencias tróficas de los culicoides en general (Murray, 1970; Bartsch et al., 2009). La identificación de la fuente de alimentación de los insectos hematófagos puede suministrar datos indirectos sobre potenciales reservorios, predecir las especies que juegan un rol importante en la transmisión de enfermedades (Bartschequiv et al., 2009) y establecer una estrategia de control eficiente de enfermedades (Haouas et al., 2007; Maleki et al., 2009).

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Identificar a nivel molecular las preferencias tróficas de hembras hematófagas del género *Culicoides* capturadas en las provincias de Pichincha, Esmeraldas, Santo Domingo de los Tsáchilas, Manabí y Bolívar.

3.2 Objetivos específicos

- Seleccionar hembras pertenecientes al género *Culicoides* que tengan el abdomen con sangre de color rojo o café intenso.
- Identificar a nivel de especie los especímenes seleccionados a través del uso de criterios morfológicos descritos en claves taxonómicas.
- Amplificar y analizar las secuencias del gen PNOC.
- Identificar el género y especie de los vertebrados de los cuales se alimentaron las especies identificadas del género *Culicoides*.

4 Área de estudio

Los culicoides fueron colectados en cinco provincias del Ecuador. La primera colecta se realizó en la provincia de Pichincha en la localidad de Paraíso Escondido (bosque húmedo tropical secundario) en Noviembre del 2012. La segunda, en la provincia de Esmeraldas, específicamente en la comunidad rural de Santo Domingo del Río Onzole (bosque húmedo tropical secundario) en Febrero del 2013. La tercera se la hizo en tres localidades de la provincia de Manabí (La Mina, Murucumbu y Caserío Agua Sucia) en marzo del 2013. Las tres localidades corresponden a un ecosistema de bosque secundario húmedo tropical. La cuarta recolección se hizo en dos localidades de la provincia de Bolívar, Caluma y

Echandía (Bosque secundario subtropical-templado) en marzo del 2013 (Tabla 1). Finalmente, se efectuó una quinta recolección en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas en agosto del 2013 (Tabla 1). Todas las muestras fueron clasificadas e identificadas en el Laboratorio de Entomología y Medicina Tropical de la Universidad San Francisco de Quito. El trabajo molecular de amplificación e identificación del gen PNOC se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

5 Materiales

5.1 Colección de dípteros

- Trampas tipo CDC (Centers for Disease Control) de luz blanca
- GPS eTrex Garmin®
- Baterías de 6V (FAMMA MR12-6)
- Cargador de baterías (VMARK)
- Mallas entomológicas
- Frascos de colección
- Etanol

5.2 Separación de culicoides

- Insectos colectados
- Estéreo microscopio Leica
- Pinzas entomológicas
- Pipetas pasteur
- Tubos de criopreservación de 2 mL

- Tubos Eppendorf de 1,5 mL

5.3 Montaje en placa de especímenes del género *Culicoides* alimentados

- Hembras del género *Culicoides* alimentadas recientemente
- Estéreo microscopio de luz Leica
- Jeringuillas de insulina NIPRO
- Agujas hipodérmicas N° 0.5 mL NIPRO
- Porta objetos.
- Cubre objetos circulares
- Solución Marc André (hidrato de cloral 40%, y ácido acético 30%)
- Goma cloral (Hidrato de Cloral 30%, Goma Arábica 20% y Glicerina 13%)

5.4 Identificación de especies del género *Culicoides*

- Especímenes hembras del género *Culicoides* con ingesta de sangre reciente (abdomen rojo o café)
- Microscopio de luz (Leica)
- Claves taxonómicas de identificación de especies del género de *Culicoides*

5.5 Extracción de ADN de especímenes del género *Culicoides*

- Tórax y abdomen de hembras con ingesta de sangre (abdomen rojo o café)
- PBS 1X (8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na₂HPO₄, 0.24g KH₂PO₄ en 800mL H₂O destilada a pH 7.4)
- DNeasy Blood & Tissue Kit Qiagen™

- Etanol absoluto y etanol al 70%,
- Microcentrifuga Eppendorf® Model 5415D
- Vórtex Labnet®
- Baño María Shel LAB ®

5.6 Amplificación del gen PNOC

- ADN de hembras culicoides con ingesta de sangre reciente
- Primers:
 - PNOC-F,5'-GCATCCTTGAGTGTGAAGAGAA-3'
 - PNOC-R,5'TGCCTCATAAACTCACTGAACC-3' (Ninio et al., 2010)
- GoTaq® Flexi Buffer Promega™
- Solución de MgCl₂ 25mM
- Mix de nucleótidos para PCR, cada uno a 10mM
- Agua para PCR
- GoTaq® DNA Polimerase Promega™
- Tubos de PCR 0.2mL. (Axygen)
- T100™ Thermal Cycler BioRad™
- Bromuro de Etidio
- TBE 10X
- Ultra Pure™ Agarosa Invitrogen™
- Cámara de Electroforesis C.B.S. Scientific Co. Model: MGU-502T
- Fuente de Poder Fisher Scientific. Model: FB300

- Foto documentador Kodak EDAS 290

5.7 Análisis de secuencias del gen PNOC

- Secuencias del gen PNOC procesadas por Functional Biosciences
- Software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA5)
- Base de Datos GenBank®
- Software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI

6 Metodología

6.1 Colección de dípteros

Previamente se tramitó los permisos de colección otorgados por el Ministerio del Ambiente para cada provincia donde se realizó las colectas (Anexo 1). Las provincias donde se realizaron las colecciones fueron: Pichincha, Esmeraldas, Santo Domingo de los Tsáchilas, Bolívar y Manabí (Tabla 1).

Se instalaron trampas tipo CDC de luz blanca a lo largo de senderos previamente seleccionados, en árboles y arbustos, entre 1.70m hasta 2.50m de altura, a partir de las 4:30 pm a 5:30 pm. Se conectó cada trampa a una batería de 6 voltios y se dejó durante toda la noche, para la captura de insectos. A la mañana siguiente, se recolectó las trampas, desde las 6:30 hasta las 7:30 am. Se registró las coordenadas geográficas con el GPS eTrex Garmin®, en cada lugar donde se realizó la colección y se desensamblaron las trampas.

Las mallas entomológicas con los insectos capturados fueron colocados a -20°C y posteriormente se transfirió a los especímenes a un frasco con etanol al 70%. Se registró la fecha, coordenadas, número de trampa y localidad de cada sitio de colección. Finalmente,

los frascos se transportaron al Laboratorio de Entomología Médica de la Universidad San Francisco de Quito y fueron almacenados a 4°C.

Todos los especímenes separados fueron transferidos a tubos de criopreservación de 2mL a -20°C.

6.2 Identificación morfológica del género *Culicoides*

Se colocó a cada espécimen, con ayuda de agujas estériles sobre una lámina porta objetos y se prosiguió a separar la cabeza, alas y los últimos segmentos del abdomen del resto del cuerpo. Se empleó un par de agujas nuevas para cada muestra.

La sección del tórax y el abdomen se almacenó a -20°C en un micro tubo de 1,5mL para la extracción de ADN. Por otra parte, se colocó la cabeza y los últimos segmentos del cuerpo en una placa y se aclaró las estructuras con la solución Marc André (Hidrato de cloral 40%, y ácido acético 30%) a la que se le flameó por 5 segundos. Luego se colocó una gota de goma cloral sobre una lámina porta objetos (Hidrato de Cloral 30%, Goma Arábiga 20% y Glicerina 13%), sobre la cual se pusieron y acomodaron la cabeza, alas y el segmento inferior del abdomen de la hembra alimentada. Una vez conseguido una posición adecuada, en la cual se aprecien con detalle todas las estructuras mencionadas, se colocó una lámina cubre objetos para conservar la posición, proteger y fijar las partes. Finalmente, las placas fueron rotuladas con la información de lugar, fecha y coordenadas. Fueron conservadas en ambiente seco en cajas diseñadas para guardar placas entomológicas.

La identificación de subgéneros, grupos de especies y especies de las hembras culicoides con ingesta de sangre reciente se realizó observando su morfología y usando claves taxonómicas (Anexo 2). Se tomó en cuenta el patrón de alas, número y forma de

espermateca, antenas y palpos de los especímenes. Se utilizó las siguientes claves taxonómicas para la identificación de culicoides: Estudio de los Subgéneros de *Culicoides* en América (Vargas, L., 1960), la clave taxonómica de *Culicoides* de Argentina (Spinelli et al., 2005), la clave para adultos del género *Culicoides* adaptado por Downes J.A. y Wirth W.W. (1981) y Atlas de fotografías de alas de *Culicoides* y artículos relacionados (Wirth et al., 1988).

La identificación de las especies fue revisada y confirmada por el especialista experto en este género el Dr. Denis Augot de la Universidad de Reims en Francia.

6.3 Extracción de ADN

Se agregó 20µL del buffer ATL Kit Quiagen a la muestra (tórax y abdomen) y se trituró con un pistilo hasta que todas las estructuras queden completamente desintegradas, se volvió a añadir 160µL de ATL Kit Quiagen y 20µL de Proteinasa K.

Se incubó a 56°C por 1 hora, se agregó 200µL de Buffer AL Kit Quiagen y se mezcló durante 15 segundos, usando el vórtex Labnet. Se volvió a incubar a 70°C por 10 minutos y se adicionó 200µL de etanol puro (96%) para luego transferir el sobrenadante a una columna QIAamp Mini spin (columna y colector) para ser centrifugada a 8.700xg por minuto. Se desechó el tubo colector de la columna con el filtrado y la columna se colocó en otro tubo recolector.

Sobre la columna QIAamp Mini spin se depositó 500µL de Buffer AW1 Kit Quiagen, se centrifugó a 8.700xg por minuto, se descartó el tubo recolector con el filtrado y se colocó un nuevo tubo colector. Se agregó 500µL de Buffer AW2 Kit Quiagen en la columna, se centrifugó a velocidad máxima o 14.000xg durante un minuto y el tubo colector se descartó con su respectivo filtrado.

Se colocó un tubo de microcentrífuga Eppendorf de 1.5mL estéril en la columna QIAamp Mini spin, se agregó 100µL de Buffer AE y se incubó a temperatura ambiente (15-25° C) por 5 minutos. Finalmente, se centrifugó cada una de las muestras a 8.700xg por minuto para obtener el ADN eludido, el cual se conservó a -20°C. La columna se descartó.

6.4 Amplificación del gen PNOC

Una vez que se obtuvo el ADN de los especímenes con ingesta de sangre, se procedió a amplificar el gen PNOC. Para preparar el master mix se empleó un volumen final de 10µL por reacción. Los reactivos empleados fueron: de (5X) GoTaq® Flexi Buffer Promega™ (1X), 25 mM de Solución de MgCl₂, 10 mM de PCR Nucleotide Mix Promega™, 50 mM de primers (PNOC F y PNOC R), 5 U/µL de GoTaq® DNA Polimerase Promega™ y agua grado PCR para aforar a 10 µL (Anexo 3). Para cada reacción se usó 1µL de ADN.

Las condiciones usadas para el termociclador T100™ Thermal Cycler BioRad™ fueron, una denaturación inicial de 96°C por 8 minutos; luego, 50 ciclos de 96°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una elongación final de 72°C por 5 minutos.

Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis con gel de agarosa al 1,5% y bromuro de etidio 0,1%, a 85V por 40 minutos (bromuro de etidio es un agente intercalante que se usa para aclarar los ácidos nucleicos). Las muestras que amplificaron el fragmento de 333pb para el gen PNOC fueron seleccionadas para ser enviadas a secuenciación a la empresa Functional Biosciences, Inc en los Estados Unidos de América.

6.5 Secuenciación y Análisis de secuencias del gen PNOC

Las primeras 43 amplificaciones del gen PNOC se secuenció en ambos sentidos; debido a la claridad de estas secuencias, se decidió que las 17 muestras restantes se secuencien en un solo sentido. Para la limpieza de secuencias y obtención de la secuencia consenso se utilizó el programa MEGA5.

Una vez obtenida la secuencia se realizó un alineamiento con las secuencias del GenBank utilizando la herramienta, de libre acceso en el internet, BLAST de la NCBI. Se consideró un porcentaje elevado (98-100%) de homología con la secuencia consenso para identificar la especie fuente de la sangre encontrada en los especímenes analizados.

7 Resultados

7.1 Colección entomológica de insectos

En total se colectó 3,317 especímenes (machos y hembras) del género *Culicoides*: En Pichincha 243 (7.32%), Esmeraldas 883 (26.62%), Manabí 880 (26.52%) Bolívar 1,117 (33.67%) y Santo Domingo de los Tsáchilas 194 (5.84%). Del total de culicoides colectados (machos y hembras) en las 5 provincias, el porcentaje de hembras fue de 62.44% y de machos 37.56% (Tabla 2).

De todas las hembras del género *Culicoides* que fueron colectadas en las 5 provincias, el 14.5% presentó un abdomen con sangre (roja, café, negra y con huevos) y el 7.4% presentaba un abdomen con sangre reciente (color café o rojo) que corresponde a 154 especímenes (Tabla 2). Y presentaron la siguiente distribución: Pichincha 31 (23,6%), Esmeraldas 96 (17,5%), Manabí 7 (1,3%), Bolívar 8 (1.1%) y Santo Domingo de los Tsáchilas 12 (8,6%) (Tabla 3).

3.1 Identificación morfológica de subgéneros y especies del género *Culicoides*

En el estudio se identificó especies pertenecientes a 2 subgéneros y 5 grupos de especies que no están incluidas dentro de ningún subgénero. El subgénero *Hoffmania* (77,27%) fue el más prevalente, luego está *Avaritia* (3,90%) y los grupos de especies (*carpenteri*, *fluvialis*, *leoni*, *limai* y *reticulatus*) representaron el 18,83% (Tabla 3, Figura 6).

La identificación de especies en base a caracteres morfológicos demostró la presencia de 18 especies del género *Culicoides* en las 5 provincias: *C. batesi*, *C. carpenteri*, *C. castillae*, *C. diabolicus*, *C. filarifer*, *C. foxi*, *C. glabellus*, *C. guttatus*, *C. heliconiae*, *C. hylas*, *C. insignis*, *C. leopoidoi*, *C. limai*, *C. ocumarensis*, *C. pifanoi*, *C. pseudodiabolicus*, *C. pusillus*, *C. tetrathyris* (Tabla 3).

Las especies más frecuentes fueron *C. guttatus* (37,66%), *C. diabolicus* (12,34%) y *C. hylas* (9,09%) (Figura 7).

C. carpenteri (Bolívar), *C. foxi* (Esmeraldas), *C. glabellus* (Pichincha), *C. insignis* (Bolívar), *C. leopoidoi* (Pichincha), *C. limai* (Pichincha), *C. pifanoi* (Esmeraldas) y *C. pseudodiabolicus* (Esmeraldas), se encontraron en un solo sitio de colección, las otras especies fueron capturadas en varios sitios de colección de las provincias de estudio. *C. castillae* se encontró en todos los sitios de colección (Tabla 3).

3.2 Identificación molecular de las fuentes de alimentación del género *Culicoides*

Se obtuvo 154 *Culicoides* hembras con sangre reciente (color café o rojo), se extrajo el ADN de 59 especímenes de los cuales 43 amplificaron el gen PNOG. Se determinó el animal del que se habían alimentado 43 *Culicoides* de diferentes especies (Tabla 3). 16 muestras de ADN de la sangre que se encontró en el abdomen de los culicoides no amplificaron el gen PNOG y correspondieron a las siguientes especies: *C. leopoldoi*, *C. limai*, *C. heliconiae* y *C. insignis* (Tabla 3).

La identificación molecular del origen de la fuente de sangre de los especímenes analizados corresponde a 4 animales vertebrados *Bos Taurus* (48,84%), *Equus caballus* (39,53%) *Choloepus didactylus, hoffmani* (9,30%) y *Homo sapiens* (2,33%) (Tabla 4, Figura 9).

Se identificó la fuente de sangre de culicoides hembras alimentados recientemente colectados en Bolívar-Caluma 3 (6,98%), Manabí-Caserío Agua Sucia 3 (6,98%), Puerto Quito-Paraíso Escondido 5 (11,63%), Santo Domingo de los Tsáchilas-Santo Domingo de los Colorados 11 (25,58%) y Esmeraldas-Santo Domingo del Onzole 21 (48,84%) (Tabla 3).

Se encontró que *C. batesi* capturado en dos localidades, Paraíso Escondido y Santo Domingo del Onzole, se alimentó de *Bos Taurus* y *Equus caballus* respectivamente. *C. diabolicus* se alimentó de *Bos Taurus* en Santo Domingo del Onzole y de *Bos Taurus* y *Equus caballus* en Santo Domingo de los Colorados. *C. hylas* se alimentó de *Choloepus didactylus/hoffmanni* en los dos lugares de colección, Caserío de Agua Sucia y Paraíso Escondido, pero sólo en Paraíso Escondido esta especie se alimentó también de *Homo*

sapiens. *C. pusillus* se alimentó de *Bos Taurus* en Santo Domingo de los Colorados y de *Equus caballus* en Santo Domingo del Onzole (Tabla 4).

Por otro lado, la fuente de alimentación de *C. castillae* capturado en todos los sitios de colección fue *Bos taurus* con excepción de Santo Domingo del Onzole donde su fuente de alimentación fue de *Bos taurus* y *Equus caballus* (Tabla 4).

4 Discusión

Para el presente estudio se realizó colecciones entomológicas en 5 provincias del Ecuador, se obtuvo 3,317 especímenes del género *Culicoides* machos y hembras (Tabla 2).

Del total de culicodes colectados en el estudio, el porcentaje de hembras (62.44%) fue mayor que el de los machos (37.6%) (Tabla 2). La mayoría de los estudios referentes a poblaciones de dípteros, reportan un altísimo porcentaje de hembras en comparación al porcentaje de machos. La cantidad de hembras y machos en las colecciones, puede variar dependiendo de varios factores como son la técnica de colección, el tipo de trampa y el lugar de captura (Veras & Castellón, 1998; Gualapuro & Zapata, 2013). Otras investigaciones han reportado porcentajes de hembras de hasta de 94.3% (Sarto & Saiz, 2003), 96.72% y 89% (García et al., 2011).

El porcentaje de hembras y machos que se colecten va a variar dependiendo de las condiciones y características del lugar en donde se realice la colección. Por ejemplo, se va a coleccionar mayor cantidad de hembras en localidades en donde exista animales que sirven como fuente de alimentación ya que las hembras del género *Culicoides* son hematófagas y se encuentran en constante búsqueda de alimento (sangre) para madurar sus huevos (Garros et al., 2011; García et al., 2011).

Del total de hembras de culicoides colectadas en este estudio, el 7.4% (154) tuvo ingesta de sangre reciente, éste es un porcentaje alto comparado con estudios similares que han presentado porcentajes de 2.38% (Garros et al., 2011), 3% (Bartschequiv et al., 2009), 2.99% (Lassen et al., 2010) e incluso más bajos de 1.9% (Walker & Davie, 1971; Lassen et al., 2012).

Para conseguir un alto porcentaje de hembras con ingesta de sangre reciente se debe realizar colecciones directamente del lugar en donde reposan ya que generalmente los dípteros hematófagos reposan después de haber ingerido sangre. Estos lugares pueden variar de acuerdo al género y especie del díptero, sin embargo de los culicoides se conoce muy poco acerca de los mismos (Garros et al., 2011).

En el presente estudio se determinó el subgénero y especie de todos los culicoides hembras alimentadas con sangre reciente, para lo cual se observó la morfología de los especímenes y se usó claves taxonómicas (Anexo 2). Del total de culicoides colectados se identificó 2 subgéneros y 19 especies (Tabla 3).

Dentro del subgénero *Hoffmania* representó el 77.24% del total de culicoides con ingesta de sangre reciente, siendo el más abundante de este estudio, este alto porcentaje concuerda con los resultados de otro estudio sobre Culicoides del Ecuador (Gualapuro & Zapata, 2013) (Tabla 3). Este subgénero está presente en varios países de América como son Guatemala, Chile, Colombia, Guyana, Ecuador, Argentina, Brasil, Bolivia, México, Nicaragua, Trinidad, Paraguay, Costa Rica, Honduras y USA (Ortiz & León, 1955; Gualapuro & Zapata, 2013).

En el subgénero *Hoffmania* se encuentra el principal vector de la Lengua Azul en América del Sur que es *C. insignis*, especie que ha sido reportada en el Ecuador (Mo et al., 1994). Esto nos demuestra el riesgo del ingreso del virus de la Lengua Azul (VLA) al Ecuador por

la comercialización de animales de países cercanos donde existe la enfermedad y los posibles vectores (comunicación personal Dr. Luis Mena de Agrocalidad).

El siguiente subgénero más abundante fue *Avaritia* (18.83%), el cual ha sido reportado en USA, México, Argentina, Venezuela, Brasil, El Salvador, Honduras, Guyana Trinidad, Paraguay, Costa Rica, Ecuador y Perú. Por otro lado, en países europeos como Dinamarca este subgénero es el más numeroso con porcentaje de 47%, e incluye vectores de VLA como la especie *C. pusillus* (Lassen et al., 2010; Lassen et al., 2012).

Se identificó 18 especies del género *Culicoides* en 154 especímenes que presentaron ingesta de sangre reciente en su abdomen. En el presente estudio la diversidad de especies es alta comparada con el número de muestra ya que otros investigaciones han encontrado 24 especies en 111.356 individuos (Lassen et al., 2012) y 13 especies en 157 de individuos (Ninio et al., 2010). La mayor diversidad de especies se encontró en las provincias de Pichincha y Esmeraldas en donde las condiciones ambientales de temperatura y humedad son óptimas para el crecimiento y desarrollo de los culicoides además de que en estos lugares se encuentran animales vertebrados que sirven de fuente de alimentación para dípteros (Boorman, 1993).

C. guttatus se encontró en 4 provincias en donde se realizó las colecciones para este estudio (Pichincha, Esmeraldas, Bolívar y Santo Domingo de los Tsáchilas) y es la especie más abundante con un porcentaje de 37% del total de hembras culicoides alimentadas recientemente. Este alto porcentaje se pudo dar ya que se ha demostrado que esta especie se adapta rápidamente a diversas condiciones ambientales, así por ejemplo *C. guttatus* es la especie del género *Culicoides* que está más dispersa en Florida (Beck, 1952; Vargas, 1960). Esta especie ha sido reportada en Venezuela, Paraguay, Argentina y Ecuador (Gualapuro & Zapata, 2013; Veras & Castellón, 1998).

C. castillae es la especie que presentó mayor dispersión, porque se halló en todos los lugares de colección. Esta especie también ha sido reportada en varios países del sur de América como: Colombia, Guatemala, Venezuela, Trinidad y México (Spinelli et al., 2009). Las especies de *Culicoides* más abundantes, son diferentes en cada localidad, por ejemplo en Brasil es *C. hylas* (Castellón et al., 1993).

Se extrajo ADN de 59 especímenes con ingesta de sangre reciente (72.88%). El porcentaje de muestras de ADN que amplificaron el gen PNOC es similar al porcentaje descrito por Lassen 2012 (76%), siendo un porcentaje bajo de amplificación comparado con otros estudios en los que determinaron la fuente de sangre de 91% (Ninio et al., 2010), 92 % (García et al., 2011) e incluso del 100% de dípteros muestreados (Molaei et al., 2006). Sin embargo, el porcentaje de muestras de ADN que amplificaron el gen PNOC en este estudio (72.8%) es mayor al promedio de sensibilidad de la técnica de ELISA (60%) (Braverman et al., 1971; Walker & Davie, 1971; Nevill & Anderson, 1972; Haouas et al., 2007).

El porcentaje de ADN de sangre de alimentación de los culicoides que no amplificó el gen PNOC fue de 27,12%, se sugiere que posiblemente a que la sangre se encontraba en proceso de digestión, o porque la fuente de alimentación provenía de un animal que no era vertebrado. Existe esta probabilidad ya que se ha encontrado que dípteros como *Aedes* que se pueden alimentar de larva o hemolinfa de insectos (Haouas et al., 2007)

En la provincia de Bolívar (Echendía), se encontró 2 especímenes del género *Culicoides* que exhibían sangre café, identificados como *C. insignis* (principal vector del virus de la Lengua Azul en América del Sur). La digestión de sangre y el número tan bajo de individuos de esta especie en la investigación, imposibilitó definir el origen de alimentación de los culicoides de la especie *C. insignis*. Varios estudios no han podido determinar la fuente de sangre de algunas especies de *Culicoides* por la misma razón

(Kirstein & Gray, 1996; Boakye et al., 1999; Ngo & Kramer, 2003; Kent & Norris, 2005). El estudio realizado por Sherlock y Guitton en 1964 en Brasil, también reportó baja cantidad de especímenes pertenecientes a la especie *C. insignis*, encontró 2 individuos de un total de 2947, lo que demuestra que esta especie no es muy numerosa en ciertas localidades.

Bos Taurus, *Equus caballus*, *Choloepus didactylus/hoffmani* y *Homo sapiens* fueron los vertebrados de los cuales se alimentaron los culicoides a los que se les determinó la fuente de sangre en este estudio. *Bos Taurus*, *Equus caballus* se han identificado como fuente de alimentación común de los culicoides (Ninio et al., 2010; Lassen et al., 2010; Lassen et al., 2012).

No se identificó a ninguna ave como fuente alimentaria de los culicoides del estudio, posiblemente porque no se encontró ninguna especie de *Culicoides* que generalmente se alimenta de aves. Una de las posibles explicaciones puede ser la altura a la que se colocó las trampas de colección. Para capturar especies arbóreas de *Culicoides* se deben colocar las trampas a nivel de dosel (3 metros sobre suelo) ya que en esta altura se encuentran generalmente las especies de *Culicoides* que se alimentan de aves (Lassen et al., 2012).

La principal fuente de alimentación fue *Bos taurus* (48.84%). La mayoría de estudios de preferencias tróficas de *Culicoides* han concluido que el ganado vacuno es el animal preferido de estos dípteros para alimentarse, con porcentajes que van desde 54% hasta 79,5%, incluso en presencia de otros vertebrados alrededor de los sitios de captura (Bartsch et al., 2009; Ninio et al., 2010; Lassen et al., 2010; Lassen et al., 2012). Esto puede deberse al gran tamaño de estos vertebrados que se considera más atractivo para la alimentación, a diferencia de otros animales más pequeños como las ovejas (Lassen et al., 2010; Lassen et al., 2012).

Equus caballus fue la segunda fuente de alimentación, este resultado se asemeja al de Ninio et al., (2010), que reportó a este vertebrado como la tercera fuente más abundante, con un porcentaje del 17%. Otros trabajos han obtenido porcentajes de 2.7% (Bartsch et al., 2009), 2.0% (Lassen et al., 2012) y 1.7% (Lassen et al., 2010). La mayoría de investigaciones de preferencias tróficas de los culicoides reportan a *Equus caballus* como fuente de alimentación con porcentajes bajos (Alarcon et al., 2012), a pesar de que este mamífero se ha encontrado presente en áreas cercanas a los lugares de colección. Al parecer estos animales son menos atractivos que las vacas para la alimentación de los culicoides y se desconoce la razón (Bartsch et al., 2009; Lassen et al., 2010; Lassen et al., 2012).

No se ha reportado a *Choloepus didactylus/hoffmani* como fuente de alimentación de los culicoides, por lo tanto el presente estudio es el primero en registrar a la sangre de este vertebrado como alimento. Las especies que se alimentaron de sangre de *Choloepus didactylus/hoffmani* fueron *C. hylas* y *C. tetrathyris* en las provincias de Bolívar (Caluma), Manabí (Caserío de Agua Sucia) y Pichincha (Paraíso Escondido) (Tabla 4). Los perezosos son conocidos como reservorio de parásitos y una conocida fuente de nutrición de dípteros de la familia Phlebotominae dentro los cuales se encuentran vectores de leishmaniasis.

En el presente estudio se registra por primera vez que la especie *C. hylas* se alimenta de sangre de *Homo sapiens* (Borkent & Spinelli, 2007; Ninio et al., 2010; Lassen et al., 2012). El humano es una fuente de alimentación poco frecuente para los culicoides (Ninio et al., 2010; Lassen et al., 2012). Se han reportado bajos porcentajes de *Culicoides* que se alimentaron de *Homo sapiens*: 2.89% (Lassen et al., 2012) y 1% (Ninio et al., 2010). Investigaciones de preferencias tróficas realizadas en bosques suburbanos y áreas con altas

densidades y abundancia de personas han presentado porcentajes de 94.8% (Alarcon et al., 2012).

Las especies que son consideradas como antropofílicas en el presente estudio son: *C. diabolicus*, *C. castillae*, *C. foxi*, *C. insignis*, *C. pifanoi* y *C. guttatus* (Borkent & Spinelli, 2007), sin embargo ninguna de estas especies se alimentó de sangre de *Homo sapiens*.

Un hallazgo interesante es que los culicoides que se alimentaron de *Choloepus didactylus/hoffmani* y *Homo sapiens* no se alimentaron ni de *Bos taurus* ni de *Equus caballus*, posiblemente por el diferente tipo de piel que tiene cada animal (Ninio et al., 2010).

Los especímenes del género *Culicoides* que se colectaron en Santo Domingo de los Tsáchilas se colectaron junto a otros animales de crianza como cerdos, vacas, caballos, cuyes, conejos, gallinas, etc. Sin embargo el 100% de culicoides se alimentaron de *Bos taurus*. Estudios han demostrado un porcentaje considerable de alimentación de cerdos o verracos salvajes (4%). A pesar de esto los culicoides de Santo Domingo de los Tsáchilas prefieren alimentarse de *Bos taurus*, vertebrado que se encontraba en bajas cantidades y alejados del lugar de colección (Bartsch et al., 2009; Lassen et al., 2010; Lassen et al., 2012).

Estudios de las preferencias tróficas de los culicoides han demostrado que muchas especies tienen diferencias definidas, como por ejemplo: *C. kibunensis* por pájaros, *C. chiopterus* y *C. deltus*, por mamíferos. En cambio, otras especies son generalistas como por ejemplo *C. festivipennis* y *C. obsoletus*. Desde el punto de vista epidemiológico las especies generalistas son más interesantes porque son capaces de alimentarse de varios vertebrados y así facilitar la transmisión de enfermedades (Alarcon et al., 2012).

Se ha reportado una variedad de animales vertebrados como fuente de alimentaria de los culicoides entre los más importantes están; conejos 20%, cerdos 4%, ovejas 4% (Ninio et al., 2010), ciervos 4.1% (Bartsch et al., 2009), 3.3 % (Lassen et al., 2012) y 0.86% (Lassen et al., 2010) cabras 4.13%, ratones 0.41%, ovejas 0.41% (Lassen et al., 2012), perros (Garros et al., 2011) y humanos 1% (Ninio et al., 2010).

5 Conclusiones

El 7.4% de las hembras culicoides tenía ingesta de sangre reciente (color café o rojo), fue difícil determinar el color de la sangre ingerida por los culicoides debido al color del cuerpo de los mismos. Este porcentaje es alto en comparación a otros estudios.

En el presente estudio se identificó 18 especies de *Culicoides*, la mayoría de ellas pertenecen al Subgénero *Hoffmania*, se encontró una variabilidad alta de especies de *Culicoides* comparado con otros estudios. *C. guttatus* es la especie con más abundancia en el estudio.

Los culicoides de nuestro estudio, se alimentaron principalmente de 4 animales vertebrados; *Bos Taurus*, *Equus caballus*, *Choloepus didactylus – hoffmani* y *Homo sapiens*.

Se reporta por primera vez que los culicoides se alimentan de sangre de *Choloepus didactylus/hoffmani*. El humano es una fuente de alimentación poco frecuente para los culicoides. *C. hylas* fue la única especie que se alimentó de *Homo sapiens*.

6 Recomendaciones

Tomar un número de muestra más grande para analizar las preferencias tróficas en lugares donde se encuentran las especies vectores del género *Culicoides*. En los mismos sitios a diferentes períodos del año.

Hacer un estudio con diferentes tipos de trampas, a diferentes alturas a partir del suelo para comparar la eficacia de las mismas y la captura de una mayor diversidad de especies.

Investigar las preferencias tróficas de *C. insignis* y *C. paraensis*, principales vectores del virus de la Lengua Azul y el virus del Oropuche.

7 Referencias bibliográficas

- Afrane, YA., Lawson, BW., Githeko, AK., Yan, G. (2005). Effects of microclimatic changes caused by land use and land cover on duration of gonotrophic cycles of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in western Kenya highlands. *J Med Entomol* , 974–980.
- Alarcon, D., Havelka, P., Schaefer, H., Segelbacher, G. (2012). Bloodmeal Analysis Reveals Avian Plasmodium Infections and Broad Host Preferences of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) Vectors. *Plos One* .
- Anderson, JR., Linhares, AX. (1989). Comparison of several different trapping methods for *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of the American Mosquito Control Association* , 325-334.
- Barber, T. L. and Jochim, M. M. (1985). Bluetongue and related orbiviruses. Progress in Clinical and Biological Research. *Alan J. Uss, New York*.
- Bartsch, S., Bauer, B., Wiemann, A., Clausen, PH., Steuber, S. (2009). Feeding patterns of biting midges of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* groups on selected farms in Brandenburg, Germany. *Parasitol Res* , 373–380.
- Bartschequiv, S., Bauer, B., Wiemann, A., Clausen, Peter. (2009). Feeding patterns of biting midges of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* groups on selected farms in Brandenburg, Germany. *Springer* .
- Beck, E. (1952). Notes on the distribution of *Culicoides* in Florida (Díptera, Ceratopogonidae). *Division of Entomology* .

- Bernardes, A. V. (2009). Sporadic Oropouche Virus Infection, Acre, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* , Vol. 15, No. 2.
- Blackwell, A., Mordue, A.J., Mordue, W. (1994). Identification of bloodmeals of the Scottish biting midge, *Culicoides impunctatus*, by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Med Vet Entomol* , 20–24.
- Blaveri, E., Kalsi, G., Lawrence, J., Queded, D., Moorey, H., Lamb, G., Kohen, D., Shiwach, R., Chowdhury, U., Curtis, D., McQuillin, A., Gramoustianou, E., Gurling, E. (2001). Genetic association studies of schizophrenia using the 8p21-22 genes: prepronociceptin (PNOC), neuronal nicotinic cholinergic receptor alpha polypeptide 2 (CHRNA2) and arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1). *European Journal of Human Genetics* , 469 - 472.
- Boakye, D.A., Tang, J., Truc, P., Merriweather, A., Unnasch, T.R. (1999). Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis. *Med Vet Entomol* , 282–287.
- Boorman, J. (1993). *Medical Insects and Arachnids*. British: Chapman & Hall.
- 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.
- Brandfio-Filho, S. B.-W. (2003). Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* , 291–296.

- Braverman, Y., Boreham, PF., Galum, R. (1971). The origin of blood meals of female *Culicoides pallidipennis* trapped in a sheepfold in Israel. *J Med Entomol* , 379–381.
- Carn, V. (1996). The role of dipterous insects in the mechanical transmission of animal viruses. *Brit Vet J* , 377–393.
- Castellón, E., Ferreira, R., Silva, M. (1993). *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the Brazilian Amazon. IV. Species collected with CDC light trap in the Ducke Forest Reserve (DFR), Amazon State, Brazil. *Acta Amazonica* , 309-310.
- Clausen, P., Stephan, A., Bartsch, S., Jandowsky, A., Hoffman, P. (2009). Seasonal dynamics of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae, *Culicoides* spp.) on dairy farms of Central Germany during the 2007/2008 epidemic of bluetongue. *Springer* .
- Daba, S. M. (1997). Vector-host-parasite inter-relationships in leishmaniasis. II. Influence of blood meal from natural vertebrate hosts with and without *Leishmania infantum* and *L. major* on the proteolytic activity in the gut of *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). *J Egypt Soc Parasitol* , 639–649.
- Daba, S., Daba, A., Shehata, MG., ElSawaf, BM. (2004). A simple microassay method for estimating blood meal size of the sand fly, *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). *J Egypt Soc Parasitol* , 173–182.
- Dillon, RJ., Lane, RP. (1993). Bloodmeal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. *Med Vet Entomol* , 225–232.
- Downes, J. (1978). Feeding and mating in the insectivorous Ceratopogonidae (Diptera). *Memoirs of the Entomological Society of Canada* , 1-62.

- Downes, J. W. (1981). Clave para adultos del género Culicoides. 396-419.
- Dyce, AL. (1969). The recognition of nulliparous and parous Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *J Aust Entomol* , 11–15.
- García-Sáenz, A., McCarter, P., Baylis, M. (2011). The influence of host number on the attraction of biting midges, Culicoides spp., to light traps. *Medical and Veterinary Entomology* .
- Garros, C., Gardes, L., Allene, J., Rakotoarivony, I., Viennet, E., Rossi, S., Balenghien, T. (2011). Adaptation of a species-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in Culicoides (Ceratopogonidae:Diptera): applications on Palaearctic biting midge species, vectors of Orbiviruses. *Infection, Genetics and Evolution* .
- Garvin, M., Greiner, E. (2003). Ecology of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) in southcentral Florida and experimental Culicoides vectors of the avian hematozoan Haemoproteus danilewskyi Kruse. *J Wildlife Dis* , 170–178.
- Gibson, C. A. (1952). The Relation of Culicoides (Diptera: Heleidae) to the Transmission of Onchocerca volvulus. *The Journal of Parasitology* , 315-320.
- Gualapuro, M., Zapata, S. (2013). Contribución al estudio de la fauna de Culicoides (Díptera: Ceratopogonidae) en la zona norte del Ecuador. *Tesis-Universidad San Francisco de Quito* .
- Haouas, N., Pesson, B., Boudabous, R., Dedet, JP., Babba, H., Ravel, C. (2007). Development of a molecular tool for the identification of Leishmania reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. *Am J Trop Med Hyg* , 1054–1059.

- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc.Biol* , 313–321.
- Hendrickx, G., Gilbert, M., Staubach, C., Elbers, A., Mintiens, K., Gerbier, G. (2006). A wind density model to quantify the airborne spread of Culicoides species during North-Western Europe bluetongue epidemic,. *Prevent Vet Med* , 162–181.
- Izurieta, R., Macaluso, M.,Watts, D., Tesh, R., Guerra, B., Cruz, L., Galwankar, S., Vermund, S. (2009). Assessing yellow fever risk in the Ecuadorian Amazon. *Public Health Research* .
- Kent, R.J., Norris, D.E. (2005). Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *Am J Trop Med Hyg* , 336-342.
- Kirstein, F., Gray, J.S. (1996). A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of Lyme borreliosis by analysis of the blood meal in its European vector Ixodes ricinus. *Appl Environ Microbiol* , 4060–4065.
- Kupferschmidt, K. (2012). Infectious disease: Scientists Rush to Find Clues On New Animal Virus. *Science* , 1028–1029.
- Lager, I. (2004). Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Veterinaria Italiana* .
- Lassen, S., Achim, S., Kristensen, M. (2012). Identity and diversity of blood meal hosts of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: Culicoides Latreille) in Denmark. *Parasites & Vectors* , 143.

- Lassen, SB., Nielsen, SA., Skovgard, H., Kristensen, M. (2010). Molecular identification of bloodmeals from biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: Culicoides Latreille) in Denmark. *Parasit Res* , 823–829.
- Lee, JH., Hassan, H., Hill, G., Cupp, EW., Higazi, TB., Mitchell, CJ., Godsey, MS Jr., Unnasch, TR. (2002). Identification of mosquito avian derived blood meals by polymerase chain reaction-heteroduplex analysis. *Am J Trop Med Hyg* , 599–604.
- Leprince, D. H. (1989). Body size of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) in relation to bloodmeal size estimates and the ingestion of *Onchocerca cervicalis* (Nematoda: Filarioidea) microfilariae. *J Am Mosq Control Assoc* , 100–103.
- Linley, J. (1985). Biting midges (Diptera, Ceratopogonidae) as vectors of nonviral animal pathogens. *J Med Entomol* , 589–599.
- Logan, J. C. (2010). Understanding and exploiting olfaction for the surveillance and control of *Culicoides* biting midges. *Ecology and Control of Vector borne Disease* , 217-246.
- Lopez, W., Nicoletti, P., Gibbs, E. (1985). Antibody to bluetongue virus in cattle in Ecuador. *Tropical Animal Health and Production* .
- Lowrie, R., Raccurt, C. (1981). *Mansonella ozzardi* in Haiti. 2. Arthropod vectors studies. *Amer J Trop Med Hyg* , 598–603.
- Magnarelli, L. A. (1981). Parity, follicular development, and sugar feeding in *Culicoides melleus* and *C. hollensis* (Diptera, Ceratopogonidae). *Environmental Entomology* , 807-811.

- Maleki-Ravasan, N., Oshaghi, MA., Javadian, E., Rassi, Y., Sadraei, J., Mohtarami, F. (2009). Blood Meal Identification in Field-Captured Sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA Assays. *Iranian J Arthropod-Borne Dis* , 8-18.
- Mehlhorn, H., Walldorf, V., Klimpel, S., Schmahl, G. (2008). Outbreak of bluetongue disease (BTD) in Germany and the danger for Europe. *Parasitol Res* , S79–S86.
- Mellor, P., Boornamn, J., Baylis, M. (2000). Culicoides Biting Midges: Their Role as Arbovirus Vectors. *Annual Review of Entomology* .
- Mo, C., Thompson, L., Homan, E., Oviedo, M., Greiner, E., González, J., Sáenz, M. (1994). Bluetongue virus isolations from vectors and ruminants in Central America and the Caribbean. Interamerican Bluetongue Team. *American Journal of Veterinary Research* , 211-215.
- Molaei, G., Andreadis, T., Armstrong, P., Anderson, J., Vossbrinck, C. (2006). Host feeding patterns of Culex mosquitoes and West Nile virus transmission, northeastern United States. *Emerg. Infect. Dis.*
- Mollereau, C., Simons, MJ., Soularue, P., Liners, F., Vassart, G., Meunier, JC., Parmentier, M. (1996). Structure, tissue distribution and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* , 8666–8670.
- Mukabana, W., Takken, W., Knols, B. (2002). Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers. *TRENDS in Parasitology* .
- Mullen, G. and Durden, L. (2009). *Medical and Veterinary Entomology*. China: Academic Press.

- Mullens, BA., Gerry, AC., Lysyk, TJ., Schmidtman, ET. (2004). Environmental effects on vector competence and virogenesis of bluetongue virus in *Culicoides*: interpreting laboratory data in a field context. *Vet Ital* , 160–166.
- Murphy, W. E. (2001). Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature* , 614–618.
- Murphy, W., Eizirik, E., O'Brien, S., Madsen, O., Scally, M., Douady, C., Teeling, E., Ryder, O., Stanhope, M., de Jong, W., Springer, M. (2001). Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics. *Science* , 2348–2351.
- Murray, D. (1970). The identification of blood meals in biting midges, (*Culicoides*: *Ceratopogonidae*). *Ann Trop Med Parasitol* .
- Nevill, EM., Anderson, D. (1972). Host preferences of *Culicoides* midges (*Diptera*: *Ceratopogonidae*) in South Africa as determined by precipitin tests and light trap catches. *Onderstepoort J Vet Res* , 147–152.
- Ngo, KA., Kramer, LD. (2003). Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with orderspecific primers. *J Med Entomol* , 215–222.
- Nieves, E. P. (2002). Influence of vertebrate blood meals on the development of *Leishmania* (*Viannia*) *Braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *Amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia* *Migonei* (*Díptera*: *Psychodidae*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* , 640–647.
- Ninio, C., Augot, D., Delecolle, J., Dufour, B., Depaquit, J. (2010). Contribution to the knowledge of *Culicoides* (*Diptera*:. *Parasitol Res* .

- Njiokou, F., Simo, G., Mbida, A., Truc, P., Cuny, G., Herder, S. (2004). A study of host preference in tsetse flies using a modified heteroduplex PCR-based method. *Acta Trop* , 117–120.
- Ortiz, I., León, L. (1955). Los Culicoides (díptera: ceratopogonidae) de la República del Ecuador. *Cada de la Cultura Ecuatoriana* .
- Sarto, V., Saiz, M. (2003). Culicoides midges in Catalonia (Spain), with special reference to likely bluetongue virus vectors. *Medical and Veterinary Entomology* , 288–293.
- Sellers, R. F. and Maarouf, A. R. (1989). Trajectory analysis and bluetongue virus serotype 2 in Florida 1982. *Canadian Journal of Veterinary Research* , 100-102.
- Sellers, R. F. and Pedgley, D. E. (1985). Possible windborne spread to western Turkey of bluetongue virus in 1977 and of Akabane virus in 1979. *Journal of Hygiene* , 149-158.
- Sherlock, I. G. (1964). Dermatozoonosis by Culicoides Bite (Díptera, Ceratopogonidae) in Salvador State of Bahia, Brazil . *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* .
- Spinelli, G., Ronderos, M., Díaz, F., Marino, P. (2005). The bloodsucking biting midges of Argentina (Diptera: Ceratopogonidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* , 137-150.
- Spinelli, G., Santamaría, E., Cabrera, O., Ronderos, M., Suárez, M. (2009). Five new species of Culicoides Latreille described from Colombia, yielding a new species list and country records (Diptera: Ceratopogonidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* , 81-92.

- Svobodova, M., Sadlova, J., Chang, KP., Volf, P. (2003). Distribution and feeding preference of the sandflies *Phlebotomus sergenti* and *P. papatasi* in a cutaneous leishmaniasis focus in Sanliurfa, Turkey. *Am J Trop Med Hyg* , 6-9.
- Tabachnick, W. (2010). Challenges in Predicting Climate and Environmental Effects on Vector-borne disease Epistystems in a Changing World . *The Journal of Experimental Biology* .
- Tabachnick, W. (2004). Culicoides and the global epidemiology of bluetongue virus infection . *Vet. Ital* , 145-150.
- Takken, W., Verhulst, N., Scholte, E., Jacobs, F., Jongema, Y., van Lammeren, R. (2008). The phenology and population dynamics of *Culicoides* spp. in different ecosystems in The Netherlands. *Prevent Vet Med* , 41–54.
- Taylor, W., P. (1987). Bluetongue in the Mediterranean region. Proceedings of a meeting in the Community Programme for Coordination of Agricultural Research, Istituto Profilattico Sperimentale dell' Abruzzo e del Molise, Teramo, Italy, 3 and 4 October 1985. *Commission of the European Communities Report EUR 10237 EN. 119 pp. Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburg.*
- Teixeira, M. C. (2005). Oropuche Virus Isolation, Southeast Brazil . *Emerging Infectious Diseases* .
- Tempelis, C.H., Nelson, R.L. (1971). Blood-feeding patterns of midges of the *Culicoides variipennis* complex in Kern County, California. *J.Med.Entomol* , 532–534.
- Tidwell, M. A. and Tidwell, M. A. (1982). Development of *Mansonella ozzardi* in *Simulium amazonicum*, *S. argentiscutum*, and *Culicoides insinuatus* from

- Amazonas, Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* , 1137-1141.
- Torr, S. H. (1998). Factors affecting the landing and feeding responses of the tsetse fly *Glossina pallidipes* to a stationary ox. *Med Vet Entomol* , 196–207.
 - Townzen, JS., Brower, AV., Judd, DD. (2008). Identification of mosquito bloodmeals using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b gene sequences. *Med Vet Entomol* , 386-393.
 - Vargas, L. (1960). The subgenera of *Culicoides* of the Americas (Diptera, Ceratopogonidae). *Rev. Biol. Trop* , 35-47.
 - Veras, R., Castellón, E. (1998). *Culicoides* Latreille (Díptera, Ceratopogonidae) in brazilian amazon. V. Efficiency of traps and baits and vertical stratification in the forest reserve Aldolpho Duke. *Revta Bras Zool* .
 - Votypka, J., Synek, P., Svobodova, M. (2009). Endophagy of biting midges attacking cavity-nesting birds. *Med. Vet. Entomol.* , 277–280.
 - Walker, AR., Davie, FG. (1971). A preliminary survey of the epidemiology of bluetongue in Kenya. *J Hyg* , 47-60.
 - Walton, TE. (2004). The History of Blue Tongue and a current global overview. *Vet Ital*, 31-38.
 - WHO, World Health Organisation for Animal. (2012). *World Organization for Animal Health*. Obtenido de Bluetong in Northern Europe: <http://www.oie.int/en/for-the-media/press-releases/detail/article/bluetongue-in->

northern-europe-an-oie-reference-laboratory-makes-a-breakthrough-in-identifying-the-v/

- 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). *American Entomological Institute*.
- Wolfgang, R.M., Takken, W., Knols, B.G.J. (2002). Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers. *Trends Parasitol* , 505–509.

8 Tablas

Tabla 1 Sitios de colección de dípteros

Provincia	Cantón	Localidad	Fecha	Latitud	Longitud	Ecosistema
Pichincha	Puerto Quito	Paraiso Escondido	23 al 24 de Noviembre del 2012	00° 85' 03" N	79° 17' 49" W	Bosque Secundario húmedo tropical alterado
Esmeraldas	Eloy Alfaro	Santo Domingo de Onzole	2 al 3 Febrero del 2013	00°48.1124" N	79°04.154'31" W	Bosque Secundario húmedo tropical alterado
Manabí	Pedernales	La Mina	29 al 30 de Marzo del 2013	00° 1' 59.15" N	79° 57' 4.3482" W	Bosque Secundario húmedo tropical alterado
	Junín	Murucumbu	29 al 30 de Marzo del 2013	00° 55' 0.11" N	80° 8' 2.565" W	Bosque Secundario húmedo tropical alterado
	El Carmen	Caserío Agua Sucia	29 al 30 de Marzo del 2013	00° 13' 32.7" N	79° 22' 41.79" W	Bosque Secundario húmedo tropical alterado
Bolívar	Caluma	Caluma	10 de Marzo del 2013	1° 40' 16.17" S	79° 14' 39.87" W	Bosque Secundario subtropical-templado
	Echendía	Echendía	12 de Marzo del 2013	1° 22' 36.18" S	79° 15' 39.085" W	Bosque Secundario subtropical-templado
Santo Domingo de los Tsáchilas	Santo Domingo de los Colorados	Quevedo, km 12	4 de Agosto del 2013	00°19' 42,5`	79°13' 55`	Bosque Secundario húmedo tropical alterado

Tabla 2 Total de especímenes del género *Culicoides* con sus porcentajes

Provincia	ESPECÍMENES DEL GÉNERO CULICOIDES						
	Total de colectados	Total machos	Porcentaje de machos	Hembras			
				Total	Porcentaje	Con ingesta de sangre (café o roja)	Porcentaje con ingesta de sangre (café o roja)
Pichincha	243	112	46,09	131	53,91	31	23,66
Esmeraldas	883	336	38,05	547	61,95	96	17,55
Manabí	880	352	40,00	528	60,00	7	1,33
Bolívar	1117	391	35,00	726	65,00	8	1,10
Santo Domingo de los Tsáchilas	194	55	28,35	139	71,65	12	8,63
Total	3317	1246	37,56	2071	62,44	154	7,44

Tabla 3 Lista de especies del género *Culicoides* con ingesta de sangre colectados en 5 provincias del Ecuador

Número de especies	Sugénero	Grupo de especie	Especie	Provincia	Número de especímenes en cada provincia	Número de especímenes de cada especie	Porcentaje de especies (%)
1	<i>Hoffmania</i>	<i>Guttatus</i>	<i>C. batesi</i>	Pichincha	1	2	1,30
				Esmeraldas	1		
2			<i>C. diabolicus</i>	Pichincha	2	19	12,34
				Esmeraldas	13		
				Bolívar	2		
				Santo Domingo de los Tsáchilas	2		
3			<i>C. filarifer</i>	Pichincha	3	9	5,84
				Esmeraldas	6		
4			<i>C. foxi</i>	Esmeraldas	4	4	2,60
5			<i>C. guttatus</i>	Pichincha	2	58	37,66
	Esmeraldas	56					
6	<i>C. insignis</i>	Bolívar	2	2	1,30		
7	<i>C. pseudodiabolicus</i>	Esmeraldas	1	1	0,65		
8	<i>C. ocumarensis</i>	Esmeraldas	5	6	3,90		
		Santo Domingo de los Tsáchilas	1				
9	<i>Hylas</i>	<i>C. heliconiae</i>	Pichincha	3	4	2,60	
			Manabí	1			
10	<i>C. hylas</i>	Pichincha	9	14	9,09		
		Manabí	5				
11	<i>Avaritia</i>	<i>Pusillus</i>	<i>C. pusillus</i>	Pichincha	1	6	3,90
	Esmeraldas			3			
	Santo Domingo de los Tsáchilas			2			
12		<i>Carpenteri</i>	<i>C. carpenteri</i>	Bolívar	1	1	0,65
13		<i>Leoni</i>	<i>C. glabellus</i>	Pichincha	1	1	0,65
14		<i>Limai</i>	<i>C. limai</i>	Pichincha	1	1	0,65
15		<i>Reticulatus</i>	<i>C. pifanoi</i>	Esmeraldas	1	1	0,65
16		<i>Fluvialis</i>	<i>C. tetrathyris</i>	Pichincha	2	9	5,84
				Esmeraldas	4		
				Bolívar	2		
				Santo Domingo de los Tsáchilas	1		
17			<i>C. castillae</i>	Pichincha	1	11	7,14
				Esmeraldas	2		
	Manabí			1			
	Bolívar			1			
	Santo Domingo de los Tsáchilas			6			
18	<i>C. leopoldoi</i>		Pichincha	5	5	3,25	
Total						154	100,00

Tabla 4 Preferencias tróficas de las especies de *Culicoides* con respecto a los sitios de captura

Especie de Culicoides	Caluma		Caserío Agua Sucia			Paraíso Escondido		Santo Domingo de los Colorados	Santo Domingo de Onzole	
	Bos taurus	Choloepus didactylus/hoffmanni	Bos taurus	Choloepus didactylus/hoffmanni	Homo sapiens	Bos taurus	Choloepus didactylus/hoffmanni	Bos taurus	Bos taurus	Equus caballus
<i>C. batesi</i>						1				1
<i>C. carpenteri</i>	1									
<i>C. castillae</i>	1		1			1		6	1	1
<i>C. diabolicus</i>								2	2	1
<i>C. filarifer</i>										1
<i>C. foxi</i>										3
<i>C. glabellus</i>						1				
<i>C. guttatus</i>									1	8
<i>C. hylas</i>				1	1		2			
<i>C. ocumarensis</i>								1		
<i>C. pifanoi</i>										1
<i>C. pusillus</i>								2		1
<i>C. tetrathyris</i>		1								
Total	3			3		5		11		21

Tabla 5 Preferencias tróficas de cada subgénero de *Culicoides*

Especie de preferencia trófica	Subgéneros de <i>Culicoides</i>		
	Avaritia	Hoffmania	No definido
Vaca	2	7	12
Perezoso		3	1
Caballo	1	14	2
Humano		1	
Total	3	25	15

9 Figuras

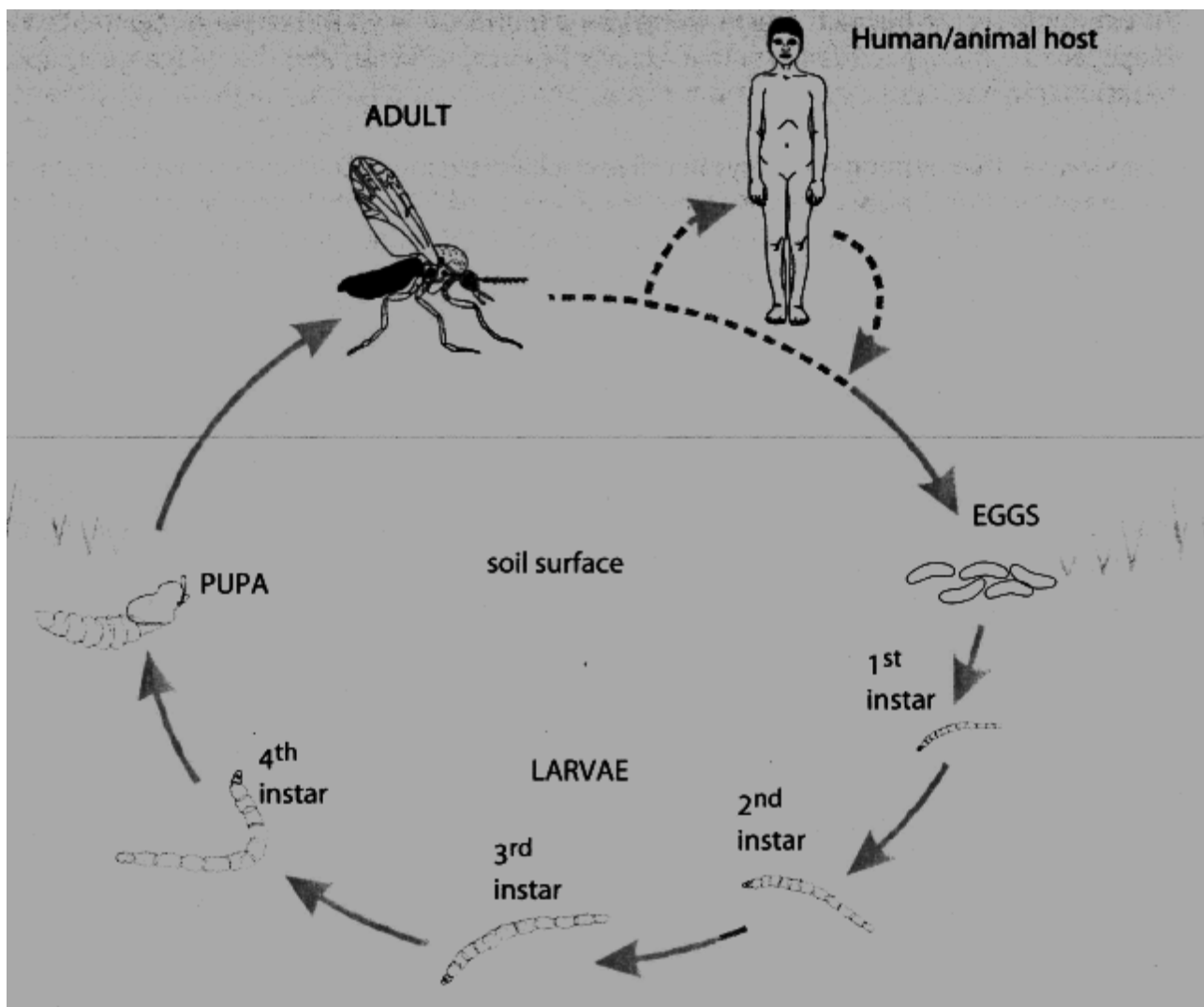


Figura 1 Ciclo de vida de las hembras del género *Culicoides*. Tomado de Logan, 2010.

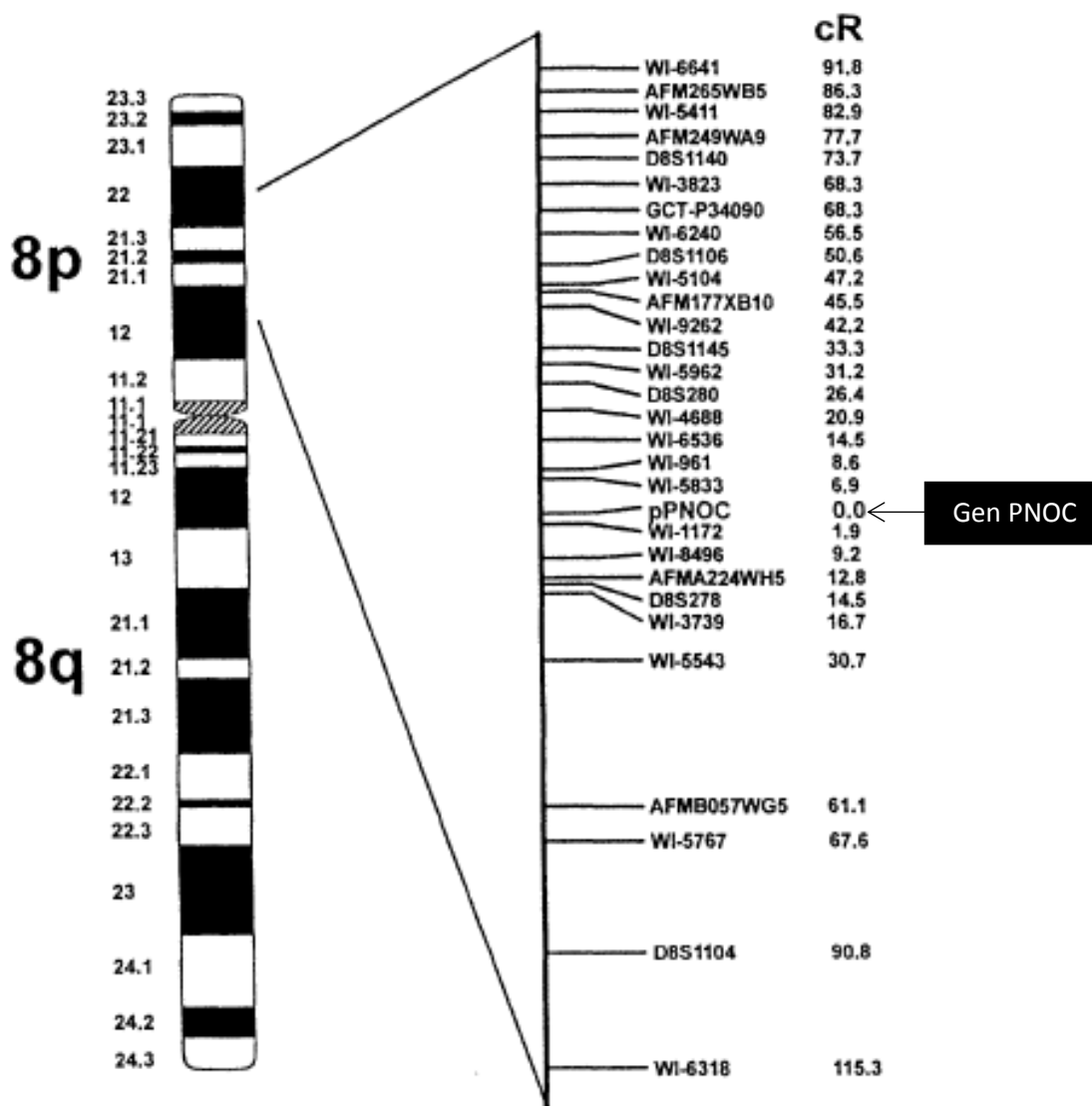


Figura 2 Ubicación del gen PNOC en el cromosoma 8 humano. Tomado de Mollereau, 1996.

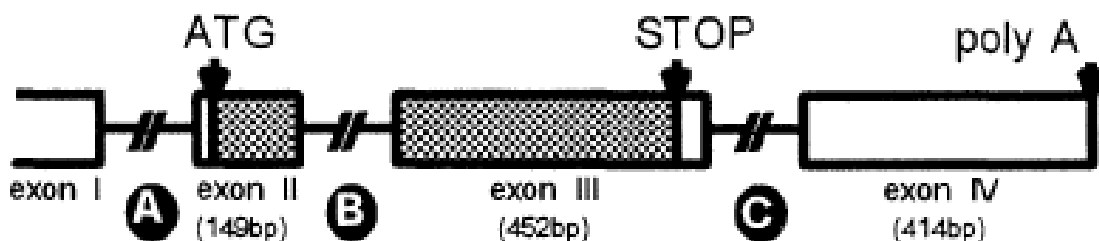


Figura 3 Organización general del gen PNOC, conformado por 5 exones. Tomado de Mollereau, 1996



Figura 4 Etapas de alimentación de los culicoides. Tomado de Barsch, 2009.

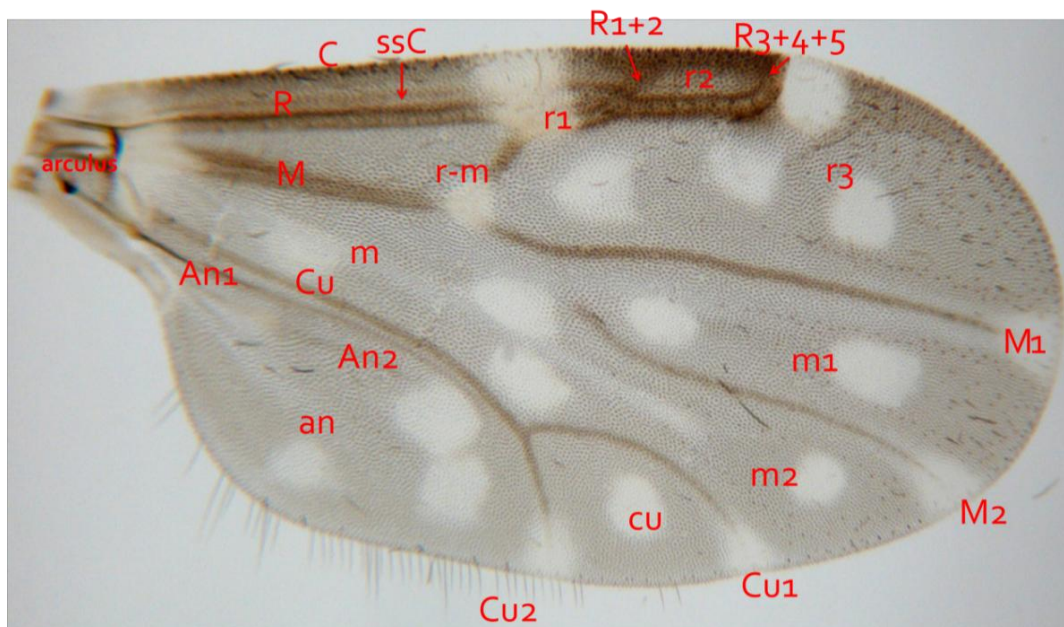


Figura 5 Patrón de pigmentación del ala de los culicoides con sus respectivos nombres. Tomada de Gualapuro, 2012

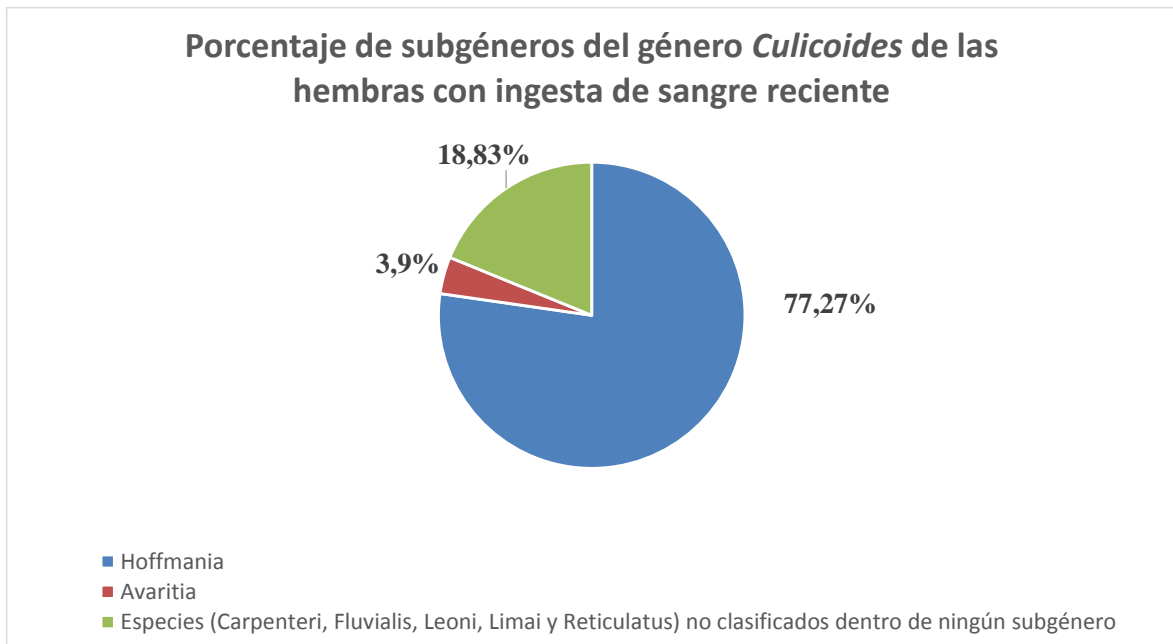


Figura 6 Porcentaje de subgéneros y especies de hembras alimentadas recientemente del género *Culicoides*

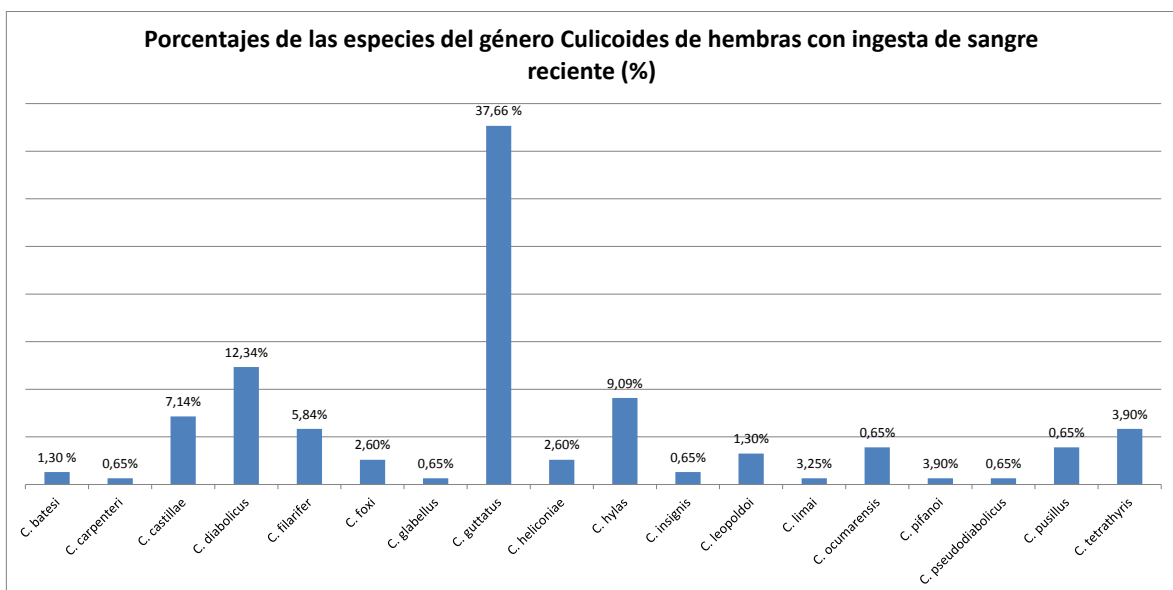


Figura 7 Porcentaje de especies de las hembras culicoides con ingesta de sangre reciente

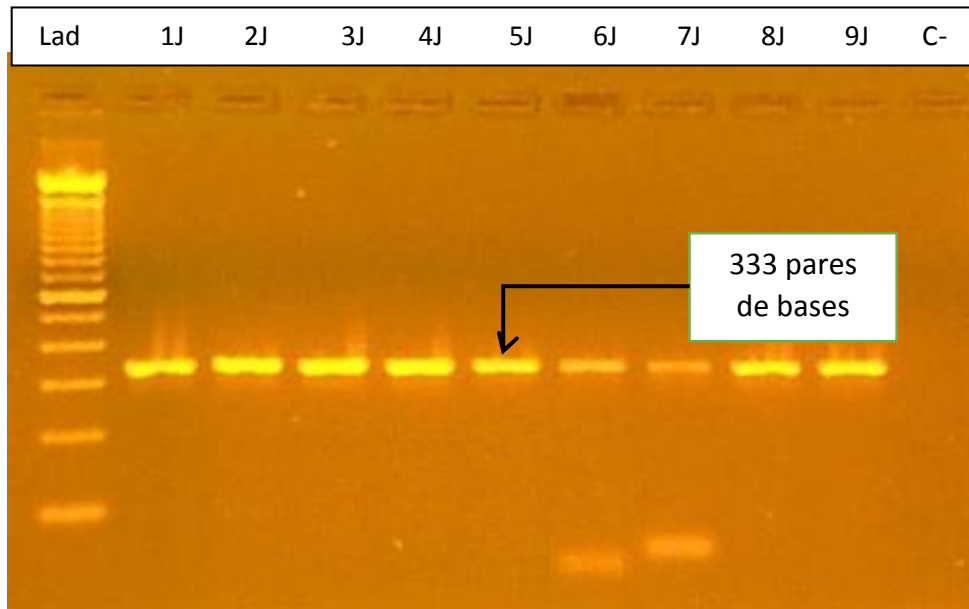


Figura 8 Electroforesis en gel de agarosa de amplificación del gen PNOC de 333 pares de bases; 1J-9J: Abdómenes de culicoides con ingesta de sangre reciente colectados en Santo Domingo de los Tsáchilas

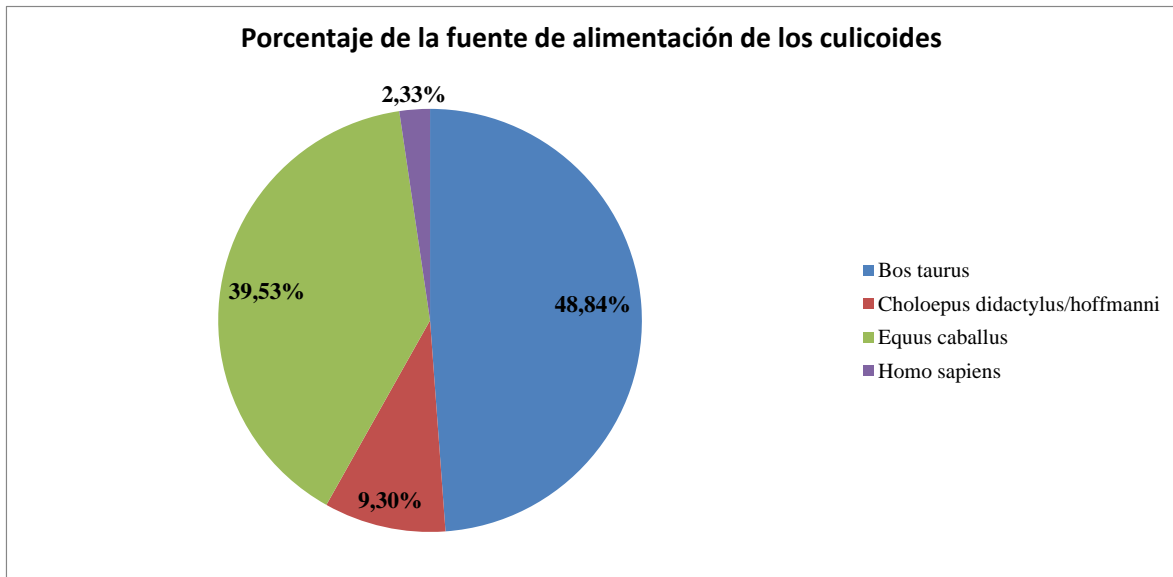


Figura 9 Porcentaje de animales vertebrados de los que se alimentaron los culicoides hembras con ingesta de sangre reciente

10 Anexos

Anexo 1.- Permisos de colección otorgados por el Ministerio del Ambiente del Ecuador para coleccionar dípteros en las provincias de Pichincha, Esmeraldas, Manabí, Bolívar y Santo Domingo de los Tsáchilas



Oficio Nro. MAE-DPAB-2013-0561

Guaranda, 16 de agosto de 2013

Asunto: Autorización del Permiso de Investigación

Señora Ph.d
Sonia Zapata Mena
Investigadora
UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
En su Despacho

De mi consideración:

Mediante oficio s/n del 29 de octubre del 2012, la Dra. Sonia Zapata, solicita a esta Cartera de Estado el permiso de Investigación Variación Genética y Capacidad de Transmisión de Leishmaniasis y otras infecciones de (*Nyssomyia trapidoi*) Diptera: Psychodidae en los cantones de Echeandía y Caluma

Mediante oficio Nro. MAE-DPAB-2013-0038 del 18 de enero del 2013, la Dirección Provincial del Ambiente Bolívar realiza las observaciones al permiso de Investigación Variación Genética y Capacidad de Transmisión de Leishmaniasis y otras infecciones de (*Nyssomyia trapidoi*) Diptera: Psychodidae en los cantones de Echeandía y Caluma

Mediante oficio s/n del 19 de marzo del 2013, la Dra. Sonia Zapata, presenta a esta Cartera de Estado las observaciones corregidas al permiso de Investigación Variación Genética y Capacidad de Transmisión de Leishmaniasis y otras infecciones de (*Nyssomyia trapidoi*) Diptera: Psychodidae en los cantones de Echeandía y Caluma

Mediante oficio Nro. MAE-DPAB-2013-0241 del 12 de abril del 2013, la Dirección Provincial del Ambiente Bolívar vuelve a realizar observaciones al permiso de Investigación Variación Genética y Capacidad de Transmisión de Leishmaniasis y otras infecciones de (*Nyssomyia trapidoi*) Diptera: Psychodidae en los cantones de Echeandía y Caluma

Mediante oficio s/n del 05 de agosto del 2013, la Dra. Sonia Zapata, presenta a esta Cartera de Estado las observaciones corregidas al permiso de Investigación Variación Genética y Capacidad de Transmisión de Leishmaniasis y otras infecciones de (*Nyssomyia trapidoi*) Diptera: Psychodidae en los cantones de Echeandía y Caluma

Al respecto comunico que luego de analizada la documentación presentada y sobre la base del Informe Técnico Nro. 009-2013-UPN-DPB-MAE del 13 de agosto del 2013, en el cual se concluye que la documentación presentada **Cumple** con los requerimientos técnicos y legales exigidos por esta Cartera de Estado.

Papel ecológico

Johnson Clay s/n entre Sáenz y Convención de 1964
Guaranda - Ecuador
Teléfono: (093 3) 2 961-874 / 2 965-165
www.ambiente.gob.ec

1/2



Oficio Nro. MAE-DPAB-2013-0561

Guaranda, 16 de agosto de 2013

Por lo que la Dirección Provincial del Ambiente Bolívar remite la Autorización del Permiso de Investigación componente fauna N° 007- UPNB-DPAB-MAE-2013 y las Obligaciones y Condiciones para la vigencia del permiso de investigación, para el proyecto: de Investigación Variación Genética y Capacidad de Transmisión de Leishmaniasis y otras infecciones de (*Nyssomyia trapidoi*) Díptera: Psychodidae en los cantones de Echeandía y Caluma de la provincia Bolívar.

Se sugiere a la investigadora del proyecto informarnos con anterioridad los días que van a tomar muestras en el campo para que el técnico encargado les acompañe en la inspección.

Con sentimientos de distinguida consideración,

Atentamente,

Sr. Frank Patricio Verdugo Méndez
DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE BOLÍVAR

Referencias:

- MAE-DPAB-2013-0740

Anexos:

- permiso de investigacion.pdf

m/c



Ministerio
del Ambiente



Oficio Nro. MAE-DPAE-2013-0125

Esmeraldas, 29 de enero de 2013

Asunto: Análisis de proyecto para emitir permiso de investigación.

Señora Ph.d
Sonia Zapata Mena
Investigadora
UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
En su Despacho

De mi consideración:

En atención a la propuesta de investigación científica de título "Variación genética y capacidad de transmisión de Leishmaniasis y otras infecciones de *Nyctomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae)" ingresada las correcciones del proyecto mediante el oficio s/n, de fecha 15 de enero del presente año en curso, esta Cartera de Estado resuelve lo siguiente:

Una vez que cumplió con los requisitos legales y técnicos, La Dirección Provincial Del Ambiente de Esmeraldas, por este medio le entrego a usted la respectiva Autorización de Investigación Científica, la cual se anexa a este documento.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

Documento firmado electrónicamente
Leda Narcisca Sorfirda Cárdena
DIRECTORA PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE ESMERALDAS

Referencias:
- MAE-DPAE-2013-0141

Copia:
Señor Ingenteo
Dono Alexander Lara Cuero
Responsable de la Unidad Patrimonio Natural Esmeraldas

Señor
Joffre Armando Palomino Arroyo
Técnico de Voto Blvastre - Dirección Provincial del Ambiente de Esmeraldas

Para entregar

Código generado por SIAES

Tercera Vía impresa a Alameda 2 040 de Tule Esmeraldas
Tercera Vía impresa a Alameda 2 040 de Tule Esmeraldas
Tercera Vía impresa a Alameda 2 040 de Tule Esmeraldas
Teléfono: (044) 2444000 - (044) 2444000
RUC: 28000250000
www.ambiente.gov.ec

1/2

AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA



Nº 003-2013-IC-FLO-FAU-DPE-MA


FLORA _____

FAUNA X

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere La Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre (TULAS LIBRO IV-Título II De la Investigación, Colección y Exportación de Flora y Fauna Silvestre), Autoriza a Sra. Sonia Elizabeth Zapata Mena, con C.I. No. 1711895993 de nacionalidad Ecuatoriana para que lleven a cabo la investigación "Variación genética y capacidad de transmisión de Leishmaniasis y otras infecciones de *Nyssomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae)".

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

1. Solicitud de: Sonia Elizabeth Zapata Mena
2. Valoración técnica del proyecto: Armando Palomino Arroyo Responsable de Vida Silvestre y Biodiversidad.
3. Auspicio de Institución Científica Extranjera: Ninguna.
4. Auspicio de Institución Científica Nacional: Universidad San Francisco de Quito.
5. Contraparte del Ministerio del Ambiente: Responsable de Patrimonio Natural y Responsable de Vida Silvestre de las Direcciones Provinciales, establecidas en la parte posterior de esta autorización.
6. Componentes Aprobados de la Investigación: 6.1. Colección de Muestras: Fauna.
7. Duración: 29 de Enero de 2013 al 30 de Enero de 2014.
8. Obligaciones del investigador: SE COMPROMETE A DEPOSITAR DUPLICADOS DE LAS COLECCIONES DE ESTA INVESTIGACIÓN EN UNA UNIDAD DE MANEJO AUTORIZADA POR EL MINISTERIO DEL AMBIENTE: LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA DE LA USFQ; ENTREGAR 2 (DOS) COPIAS DEL INFORME FINAL, 1 (UNA) COPIA A LAS DIRECCIONES PROVINCIALES DONDE REALIZÓ LA INVESTIGACIÓN, EN ESPAÑOL, IMPRESO Y DIGITAL EN FORMATO PDF; ENTREGAR LA LOCALIZACIÓN EXACTA DE LOS ESPECIMENES COLECTADOS U OBSERVADOS, UNA COPIA DE LAS FOTOGRAFÍAS QUE FORMEN PARTE DE LA INVESTIGACIÓN EN FORMATO DIGITAL AL MINISTERIO DEL AMBIENTE Y CUMPLIR CON TODOS LOS REQUERIMIENTOS ESTABLECIDOS POR LOS NUMERALES EN LA PARTE POSTERIOR DE ESTA AUTORIZACIÓN. EL PLAZO DE ENTREGA DEL INFORME VENCE EL 30 DE ENERO DEL 2014.
9. Del cumplimiento de las obligaciones dispuestas en el párrafo anterior se responsabiliza a: Sonia Elizabeth Zapata Mena.



Leda Narciso Cardenas Araujo

Directora Provincial del Ministerio del Ambiente de Píemaldán

CC: Unidad de Patrimonio Natural
Responsable de Vida Silvestre

OBLIGACIONES Y CONDICIONES PARA LA VIGENCIA DE ESTA AUTORIZACIÓN:

10. ESTA AUTORIZACIÓN ES EMITIDA BAJO LOS TÉRMINOS APROBADA EN LA PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN, POR TANTO NO HABILITA EXPORTACIÓN O MOVILIZACIÓN DE FAUNA.
11. SE AUTORIZA LA INVESTIGACIÓN EN LAS PROVINCIAS BAJO LA JURISDICCIÓN DE LAS DIRECCIONES PROVINCIALES QUE SE RESALTAN A CONTINUACIÓN: ESMERALDAS.
12. SE AUTORIZA LA COLECCIÓN DE MUESTRAS DE FAUNA SEGÚN LO ESTABLECIDO EN EL PROYECTO PRESENTADO.
13. SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES MATERIALES Y/O EQUIPOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN:

EQUIPO Y MATERIALES	
Trampa de las trépanos tipo CDC, ETANOL AL 100%	Placas para objetos
Instrumentos para objetos	Carta Civil
Microscopio compuesto	Mesa de GELMP
Equipos PCR	Programas de bases de datos

14. LAS MUESTRAS PRODUCTO DE ESTA INVESTIGACIÓN DEBERÁN SER CATALOGADAS POR INDIVIDUO, DESDE EL NÚMERO 001-006-3013-FC-FLD-PAU-DPE-MA, HASTA 500-009-3013-FC-FLD-PAU-0PE-MA, BASADO EN LA SOLICITUD DE INVESTIGACIÓN.
15. LOS INDIVIDUOS QUE SE DESTINAN PARA COLECCIÓN EN ESTA INVESTIGACIÓN, DEBERÁN SER PRESERVADOS, CURADOS Y DEPOSITADOS EN LA UNIDAD DE MANEJO AUTOGESTIVA POR EL MINISTERIO DEL AMBIENTE, DE ACUERDO A LO ESPECIFICADO EN EL NUMERAL 9 DE ESTA AUTORIZACIÓN, QUIEN CERTIFICARÁ EL INGRESO A SU COLECCIÓN.
16. EL CÚPO ASIGNADO PARA COLECTAR MUESTRAS EN ESTA INVESTIGACIÓN ES DE 500 MUESTRAS.
17. EN EL CASO DE ENCONTRARSE NUEVAS ESPECIES, DEBERÁ NOTIFICARSE A LA DIRECCIÓN NACIONAL DE BIODIVERSIDAD LA DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE AJUNTANDO LA RESPECTIVA PUBLICACIÓN. LOS ESPÉCIMENES TIPO DEBERÁN DEPOSITARSE EN LA UNIDAD DE MANEJO AUTORIZADA POR EL MINISTERIO DEL AMBIENTE DE ACUERDO A LO ESPECIFICADO EN EL NUMERAL 8 DE ESTA AUTORIZACIÓN.
18. NO SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE ARMAS DE FUEGO, EXPLOSIVOS O SUSTANCIAS VENENOSAS COMO METODOLOGÍA DE ESTA INVESTIGACIÓN.
19. LOS RESULTADOS DE ESTA INVESTIGACIÓN DEBERÁN SER ENTREGADOS AL MINISTERIO DEL AMBIENTE CONFORME LO ESTABLECE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL VIGENTE.
20. NINGÚN ESPÉCIMEN PRODUCTO DE ESTA INVESTIGACIÓN PODRÁ SER UTILIZADO PARA USO COMERCIAL O COMO MATERIAL PARA MANEJO (INSTL) / EXISTL, SIN LA CORRESPONDIENTE AUTORIZACIÓN DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE.
21. ESTAS MUESTRAS NO PODRÁN SER UTILIZADOS EN CUALQUIER ACTIVIDAD DE BIOPROSPECCIÓN NI ACCESO A RECURSO GENÉTICO SIN LA CORRESPONDIENTE AUTORIZACIÓN DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE.
22. PARA EL INGRESO A ÁREAS DE PROPIEDAD PRIVADA LOS INVESTIGADORES DEBERÁN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN DEL RESPECTIVO PROPIETARIO.
23. PARA LA MOVILIZACIÓN DE TODOS LOS EJEMPLARES COLECTADOS EN ESTA AUTORIZACIÓN EL INVESTIGADOR DEBERÁ CONTAR CON LA RESPECTIVA ORDEN DE MOVILIZACIÓN EMITIDA POR LAS DIRECCIONES PROVINCIALES DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE.
24. ESTA AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA PODRÁ SER RENOVADA ANUALMENTE PREVIÓ AL CUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES CONTRAIDAS POR EL INVESTIGADOR, ENTREGA Y APROBACIÓN DE INFORMES PARCIALES O FINALES EN LAS FECHAS INDICADAS.
25. SE SOLICITARÁ PRÓBROGÁ QUINCE DÍAS ANTES DE LA FECHA DE VENCIMIENTO QUE INDICA ESTE DOCUMENTO.
26. EL REGISTRO DE LA LOCALIZACIÓN EXACTA DE LOS ESPÉCIMENES COLECTADOS U OBSERVADOS ASÍ COMO FOTOGRAFÍAS, INFORME PARCIAL O FINAL DEBERÁ SER ENTREGADO EN FORMATO DIGITAL PDF, PARA SU INGRESO AL SISTEMA DE INFORMACIÓN DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE (INCLUYENDO INFORMACIÓN SOBRE LAS COORDENADAS GEOGRÁFICAS DATUM WGS 84) Y PARA A LA PÁGINA WEB DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE.
27. TODO USO INDEBIDO DE ESTA AUTORIZACIÓN, ASÍ COMO EL INCUMPLIMIENTO DE ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS O TÉCNICOS ESTABLECIDOS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS DE ACUERDO A LA CODIFICACIÓN A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE ÁREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE Y AL TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA Y DE LAS NORMATIVAS PERTINENTES.
28. TASA POR AUTORIZACIÓN: 20 VIENTE DÓLARES DEPOSITADOS CON REFERENCIA N° 2330027 DEL 31 DE OCTUBRE DEL 2013 EN EL BANCO NACIONAL DE FOMENTO CUENTA 0018000785.



Ministerio
del Ambiente



GOBIERNO PROVINCIAL DE
MANABÍ

Oficio Nro. MAE-CGZ4-DPAM-2012-4261

Portoviejo, 25 de diciembre de 2012

Señora Ph.d
Sonia Zapata Mena
Investigadora
UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
En su Despacho

De mi consideración:

Esta Dirección Provincial de Manabí del Ministerio del Ambiente, entrega una autorización de investigación No. 014 AP-DPM-MA para que se lleve a cabo la investigación denominada " Variación genética y capacidad de transmisión de Leishmaniasis y otras infecciones de Nyssomyia trapidoi "

Todas las investigaciones que contemplen estudios genéticos deberán cumplir con la firma del Contrato Macro, de acuerdo a lo estipulado en el Decreto Ejecutivo 905 sobre el reglamento al acceso del recurso genético, en los posteriores meses le estaremos haciendo llegar los requisitos para el respectivo contrato.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

Sra. Abg. Andrea María Pinargote Quinteros
COORDINADORA GENERAL ZONAL - ZONA 4 (MANABÍ SANTO DOMINGO DE LOS TSACHILAS)
DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE MANABÍ, SUBROGANTE

Referencias:

- MAE-UAF-DPAM-2012-4612

Anexos:

- universidad san francisco 18-12.pdf
- Autorización de investigación No.014 AP-DPM-MA

jc/wz



AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

No. 014 AP-DPM-MA

FLORA ()

FAUNA (X)

OTROS ()

Portoviejo, 21 de diciembre de 2012

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre, autoriza a la Ph.D. Sonia Elizabeth Zapata Mena con número de cedula 171189599-3 de Nacionalidad Ecuatoriana para que lleve a cabo la investigación científica: "*Variación genética y capacidad de transmisión de Leishmaniasis y otras infecciones de Nyssomyia trapidoi (Diptera: Psychodidae)*" en los siguientes cantones: Portoviejo, El Carmen, Paján, Calceta, Junín de la provincia de Manabí.

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

- 1- Solicitud de la Ph.D. Sonia Zapata Directora del proyecto. Universidad San Francisco de Quito
- 2- Valoración técnica del proyecto: Blga. Julia Cordero.- Técnico de Patrimonio Natural de la Dirección Provincial de Manabí. Ministerio del Ambiente.
- 3- Auspicio de la Institución Científica Extranjera: Ninguna
- 4- Auspicio de la Institución Nacional: Universidad San Francisco de Quito.
- 5- Contraparte del Ministerio del Ambiente: Loda. Johanna Moreira, técnico de la Unidad de Patrimonio Natural de la Dirección Provincial de Manabí del Ministerio del Ambiente.
- 6- Complementos autorizados de la investigación: Se considera coleccionar 500 especímenes de arenillas o manta blanca.
- 7- Duración: Del 21 de diciembre de 2012 hasta el 21 de diciembre de 2013.
- 8- Nombre de la investigadora principal: Sonia Elizabeth Zapata Mena.
- 9- Este permiso autoriza estudio genético de la especie solo con fines científicos pero no para bioprospección.

Autorización de Investigación Científica N° 014 RM-DPM-MAE "Variación genética y capacidad de transmisión de Leishmaniasis y otras infecciones de *Nyssomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae)" en los siguientes cantones: El Carmen, Paján, Calceta, Junín de la provincia de Manabí. Ph.D. Sonia Elizabeth Zapata Mena

DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE
PICHINCHA

**AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA**

Nº 13-2012-IC-FAU-DPAP-MA
Quito, 24 de agosto de 2012



**Ministerio
del Ambiente**

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre, autoriza a: Sonia Elizabeth Zapata, con C.C. 1711895993, de nacionalidad ecuatoriana, y Moisés Rubén Gualapuro, con C.C. 1003124284, de nacionalidad ecuatoriana y estudiante del programa de licenciatura en Biotecnología de la Universidad San Francisco de Quito, para que lleven a cabo la investigación titulada "Contribución al estudio de la fauna de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) en la zona norte del Ecuador". De acuerdo a las siguientes especificaciones:

1. Solicitud de autorización de: Sonia Elizabeth Zapata (directora del proyecto), mediante oficio del 02 de agosto del 2012, y recibido el 23 de agosto del 2012.
2. Valoración técnica del proyecto: Verónica Sandoya y Xavier Cueva.
3. Auspicio de Institución Científica Nacional: Universidad San Francisco de Quito, Departamento de Ciencias Biológicas y Ambientales, Instituto de Microbiología – Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical.
4. Auspicio de Institución Científica Extranjera: Ninguna.
5. Contraparte del Ministerio del Ambiente: Unidad de Patrimonio Natural de la Dirección Provincial del Ambiente Pichincha.
6. Complementos autorizados de la investigación: Colección de muestras de dípteros.
7. Duración: Desde 24 de agosto de 2012, hasta 24 de agosto de 2013, de acuerdo a la normativa vigente.
8. Obligaciones de los investigadores:
 - a. ENTREGAR DUPLICADOS DE TODAS LAS COLECCIONES PRODUCTO DE LA INVESTIGACIÓN AL MUSEO ECUATORIANO DE CIENCIAS NATURALES (MECN).
 - b. ENTREGAR UNA COPIA IMPRESA (EN AMBAS CARAS) Y UNA DIGITAL DE LOS RESULTADOS FINALES DE LA INVESTIGACIÓN, A TODAS LAS DIRECCIONES PROVINCIALES EN DONDE SE REALICE EL ESTUDIO, EN CASTELLANO, INCLUYENDO LA LOCALIZACIÓN EXACTA (COORDENADAS UTM) DE LOS ESPECÍMENES COLECTADOS, COPIA DE LAS FOTOGRAFÍAS Y TODOS LOS DOCUMENTOS QUE FORMEN PARTE DE LA MISMA.
 - c. CERTIFICACIÓN DE LA ENTREGA DE LOS ESPECÍMENES AL MECN.
 - d. EL PLAZO DE ENTREGA DEL INFORME FINAL VENCE EN FEBRERO DE 2013.
9. Del cumplimiento de las obligaciones dispuestas en el numeral anterior y de las observaciones detalladas al reverso, se responsabiliza a: Moisés Rubén Gualapuro y Sonia Elizabeth Zapata.

Atentamente,


Dr. Juan Carlos Andrés Moscoso
DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE PICHINCHA
DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE PICHINCHA

Dirección Provincial del Ambiente Pichincha MAE, Calle Luis Cordeiro 752 y Av. 6 de Diciembre,
Edificio CAROPUS PLAZA, Tercer piso, Quito-Ecuador. Telfax (593-2) 2565-741 www.ambiente.gob.ec

**ESPECIFICACIONES DE LA AUTORIZACIÓN INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
N° 13-2012-IC-FLO-DPAP-MA
FLORA () FAUNA (X)**

- Se autoriza la investigación en la Provincia de Pichincha, sectores: Río Verde (Pacto) y Guayabillas (área de influencia del Proyecto Toachi-Pilatón).
- En caso de involucrarse propiedades particulares, los investigadores deberán obtener el permiso correspondiente de los propietarios.
- Se autoriza la colección de 1000 especímenes, machos y hembras, según la propuesta de investigación, con la finalidad de identificar morfológicamente especies del género *Cuicoides* spp., y describir posibles nuevas especies del mismo.
- Se autoriza el uso de los siguientes equipos y materiales: trampas CDC de luz blanca, fundas de tela y plásticas, frascos plásticos, alcohol al 70%, tubos eppendorf, pinzas entomológicas, cajas petri, material de escritorio.
- Duplicados de los especímenes colectados se entregarán al Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales (MECN), con la certificación correspondiente.
- Esta autorización es emitida bajo los términos expresados en la propuesta de investigación, en tal sentido NO HABILITA EL MANEJO DE FAUNA/ FLORA O MICROORGANISMOS.
- Ningún espécimen producto de esta investigación podrá ser utilizado para uso comercial, o como material para manejo *in situ* o *ex situ*.
- Los especímenes colectados no podrán ser utilizados para actividades de bioprospección, el acceso a recursos genéticos se realizará únicamente con fines netamente científicos, conforme al compromiso firmado por Sonia Zapata.
- Los resultados de esta investigación, deberán ser entregados al Ministerio del Ambiente, conforme lo establece la legislación vigente (Art. Del 5 al 19 del Título II del TULSMA (Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente), así como también el registro de la localización exacta de las muestras colectadas, fotografías, informe parcial y/o final y todos los productos resultado de esta investigación, tanto en formato impreso como digital.
- Para la movilización y exportación, de todos los ejemplares colectados mediante esta autorización, el investigador deberá contar con los respectivos permisos emitidos por la Dirección Provincial del Ambiente Pichincha del Ministerio del Ambiente.
- En caso de prórroga, la solicitud deberá realizarse quince días antes de la fecha de vencimiento que indica este documento.
- TODO USO INDEBIDO DE ESTA AUTORIZACIÓN, ASÍ COMO EL INCUMPLIMIENTO DE LOS ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS O TÉCNICOS, ESTABLECIDAS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS CONFORME A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE ÁREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE CODIFICADA, Y AL TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN SECUNDARIA DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE.
- La tasa por concepto de emisión de autorización es de: USD\$ 20 (veinte dólares), depositada en la cuenta 0010000785 del Banco Nacional de Fomento, mediante papeleta de depósito No. 1111875, con fecha 14 de agosto del 2012.

 AA/vs/bc
24-VIII-2012

DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE
PICHINCHA

**AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA**

Nº 13-2012-IC-FAU-DPAP-MA
Quito, 24 de agosto de 2012



El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre, autoriza a: Sonia Elizabeth Zapata, con C.C. 1711895993, de nacionalidad ecuatoriana, y Moisés Rubén Gualapuro, con C.C. 1003124284, de nacionalidad ecuatoriana y estudiante del programa de licenciatura en Biotecnología de la Universidad San Francisco de Quito, para que lleven a cabo la investigación titulada "Contribución al estudio de la fauna de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) en la zona norte del Ecuador". De acuerdo a las siguientes especificaciones:

1. Solicitud de autorización de: Sonia Elizabeth Zapata (directora del proyecto), mediante oficio del 02 de agosto del 2012, y recibido el 23 de agosto del 2012.
2. Valoración técnica del proyecto: Verónica Sandoya y Xavier Cueva.
3. Auspicio de Institución Científica Nacional: Universidad San Francisco de Quito, Departamento de Ciencias Biológicas y Ambientales, Instituto de Microbiología - Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical.
4. Auspicio de Institución Científica Extranjera: Ninguna.
5. Contraparte del Ministerio del Ambiente: Unidad de Patrimonio Natural de la Dirección Provincial del Ambiente Pichincha.
6. Complementos autorizados de la Investigación: Colección de muestras de dípteros.
7. Duración: Desde 24 de agosto de 2012, hasta 24 de agosto de 2013, de acuerdo a la normativa vigente.
8. Obligaciones de los investigadores:
 - a. ENTREGAR DUPLICADOS DE TODAS LAS COLECCIONES PRODUCTO DE LA INVESTIGACIÓN AL MUSEO ECUATORIANO DE CIENCIAS NATURALES (MECN).
 - b. ENTREGAR UNA COPIA IMPRESA (EN AMBAS CARAS) Y UNA DIGITAL DE LOS RESULTADOS FINALES DE LA INVESTIGACIÓN, A TODAS LAS DIRECCIONES PROVINCIALES EN DONDE SE REALICE EL ESTUDIO, EN CASTELLANO, INCLUYENDO LA LOCALIZACIÓN EXACTA (COORDENADAS UTM) DE LOS ESPECÍMENES COLECTADOS, COPIA DE LAS FOTOGRAFÍAS Y TODOS LOS DOCUMENTOS QUE FORMEN PARTE DE LA MISMA.
 - c. CERTIFICACIÓN DE LA ENTREGA DE LOS ESPECÍMENES AL MECN.
 - d. EL PLAZO DE ENTREGA DEL INFORME FINAL VENCE EN FEBRERO DE 2013.
9. Del cumplimiento de las obligaciones dispuestas en el numeral anterior y de las observaciones detalladas al reverso, se responsabiliza a: Moisés Rubén Gualapuro y Sonia Elizabeth Zapata.

Atentamente,



Dr. Juan Andrés Moscoso
DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE PICHINCHA

Anexo 2.- Clave para adultos del género *Culicoides* año 1981, Pag: 396-419 (Downes, 1981).

Clave para adultos del género *Culicoides*

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, *Oecacta* Poey, *Wirthomyia* Vargas)
Distal portion of cell r2+3 in a pale area (Fig. 21). Wing, palpus, and paramères 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 3.- Condiciones de PCR para amplificar el gen PNOC de ADN de sangre de alimentación de los culicoides

Master Mix PCR para PNOC				
Número de reacciones: 20				
Volumen total: 10μL				
Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volúmen de una reacción	Volumen de Máster mix
PCR Buffer	5 X	5 X	2 μ l	40 μ l
MgCl₂	25 mM	25 mM	1,2 μ l	24 μ l
dNTPs	1 mM	10 mM	0,7 μ l	14 μ l
Go Flexi® Taq Promega™	5 U/ μ l	5 U/ μ l	0,05 μ l	1 μ l
Primer pnoc F	10 μ M	50 mM	0,08 μ l	1,6 μ l
Primer pnoc R	10 μ M	50 mM	0,08 μ l	1,6 μ l
H₂O grado PCR			4,89 μ l	97,8 μ l
Volúmen total del máster mix			9 μ l	180 μ l
ADN de sangre de Culicoide			1 μ l/rxn	