

Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Doctorado en Ciencias Aplicadas

Doctoranda
Lic. Mahia Mariel AYALA

Taxonomía molecular aplicada al estudio de
Culicoides insignis **Lutz (Diptera:**
Ceratopogonidae) en la
provincia de Misiones

Tesis de Doctorado presentada para obtener el título de “Doctor en Ciencias Aplicadas”

Director
Dr. Gustavo R. SPINELLI

Co-Director
Dr. Dardo A. MARTÍ

Posadas, 2019



Esta obra está licenciada bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



Universidad Nacional de Misiones
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y
Naturales



**Taxonomía molecular aplicada al estudio de
Culicoides insignis Lutz (Diptera: Ceratopogonidae) en la
provincia de Misiones**

Por Lic. Mahia Mariel AYALA

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales
de la Universidad Nacional de Misiones para optar al grado académico de

DOCTOR EN CIENCIAS APLICADAS

Posadas, República Argentina

2019

Director
Dr. Gustavo R. SPINELLI

Co-director
Dr. Dardo A. MARTÍ

TRIBUNAL EXAMINADOR (Resolución Consejo Directivo N°)

Dra. Corina Marta BERÓN	INBIOTEC-CONICET
Dra. María Isabel FONSECA	Universidad Nacional de Misiones
Dr. Domingo Javier LIOTTA	Universidad Nacional de Misiones

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA (Resolución Consejo Directivo N°)

Posadas, ... de de 2019

**Taxonomía molecular aplicada al estudio de *Culicoides insignis* Lutz
(Diptera: Ceratopogonidae) en la provincia de Misiones**

Mahia Mariel AYALA

Lugar de desarrollo del trabajo de tesis:

Instituto de Biología Subtropical (IBS UNaM-CONICET)
Centro de Investigaciones Entomológicas - PTMi
Instituto de Biotecnología de Misiones “Dra. María Ebe Reca”- UNaM

COMISIÓN DE SUPERVISIÓN (Resolución Consejo Directivo N°)

Dra. María I. FONSECA	Universidad Nacional de Misiones
Dr. Pablo I. MARINO	Universidad Nacional de La Plata
Dr. Pedro D. ZAPATA	Universidad Nacional de Misiones

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS APLICADAS

Proyecto de Carrera N° 10933/11
Con reconocimiento de la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación
Universitaria (CONEAU) N° 344/11.

INDICE

Resumen	i
Abstract	ii
Introducción	iii
Objetivos	v
Capítulo 1. Marco teórico	1
1.1 Generalidades.....	1
1.1.1 Importancia sanitaria	5
1.1.2 Dermatitis y dermatozoonosis	9
1.1.3 Importancia biológica y económica.....	10
1.1.4 Otros.....	11
1.2 Taxonomía y marcadores moleculares aplicados en <i>Culicoides</i>	12
1.2.1 Taxonomía.....	12
1.2.2 ADN ribosomal y espaciadores internos.....	13
1.2.3 ADN mitocondrial y códigos de barra o barcode.....	14
Capítulo 2. Materiales y Métodos	18
2.1 Área de estudio	18
2.2 Recolección e identificación de especímenes adultos.....	19
2.3 Análisis del efecto de las variables climáticas en poblaciones de <i>C. insignis</i> en Posadas.....	22
2.4 Colecta de estados inmaduros y caracterización de criaderos	23
2.5 Cría de estados inmaduros de <i>Culicoides</i> en el laboratorio. Limpieza, acondicionamiento y montaje.....	24
2.6 Extracción del ADN genómico.....	25
2.7 Amplificación por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	25
2.8 Secuenciamiento y análisis bioinformático de las secuencias ITS-1 y COI	26
2.8.1 Análisis de datos y diseño del cebador sentido para <i>C. insignis</i>	27
2.8.2 Estandarización de las condiciones de PCR para la detección molecular de <i>C. insignis</i> y cálculos de especificidad	28
2.8.3 Cálculos de distancia entre <i>C. insignis</i> y otras especies de <i>Culicoides</i>	28
Capítulo 3. Resultados	30
3.1. Identificación morfológica de especies de <i>Culicoides</i>	30
3.1.1 Especies de <i>Culicoides</i> recolectadas en Posadas	37
3.1.2 Efecto de las variables climáticas en la abundancia de <i>C. insignis</i> en Posadas	39
3.1.3 Especies de <i>Culicoides</i> recolectadas en Campo Grande.....	41
3.1.4 Estados inmaduros	43
3.2. Caracterización molecular de <i>C. insignis</i>	47
3.2.1 Extracción del ADN genómico y amplificación de las regiones ITS1 y COI	47
3.2.2 Análisis bioinformático de secuencias ITS-1 de <i>C. insignis</i> y otras especies vectoras del BTV	51
3.2.3 Estandarización de las condiciones de PCR para detección molecular de <i>C. insignis</i> y cálculos de especificidad	53
3.2.4 Amplificación específica en larvas de <i>C. insignis</i>	53
3.2.5 Análisis de distancia entre <i>C. insignis</i> y otras especies de <i>Culicoides</i>	55
3.2.6 Obtención de la secuencia <i>barcode</i> para <i>C. insignis</i>	57
Capítulo 4. Discusión	59
4.1. Riqueza específica y distribución de <i>Culicoides</i> en Misiones	59
4.2. Estados inmaduros	63
4.3. Biología molecular aplicada a <i>Culicoides</i>	65
4.4. Caracterización molecular de <i>Culicoides insignis</i>	67
Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones	70
5.1. Conclusiones	70
5.2. Recomendaciones	70
Referencias bibliográficas	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A- Larva; B- Pupa y C- Adulto de *Culicoides* sp
- Figura 2.** Ilustración del ala de una hembra de *Culicoides insignis*
- Figura 3.** Ejemplar hembra de *C. insignis*
- Figura 4.** Dermatitis causada por picaduras de *Culicoides* spp.
- Figura 5.** Localización y organización del ADN ribosomal (ADNr)
- Figura 6.** Estructura y organización del genoma mitocondrial
- Figura 7.** Trampa de luz tipo CDC y sitios de instalación
- Figura 8.** Búsqueda de estados inmaduros de *Culicoides* spp.
- Figura 9.** Sitios de muestreo de *Culicoides* en la provincia de Misiones
- Figura 10.** Fluctuación poblacional de *C. insignis* en la Ciudad de Posadas, Misiones, entre enero y diciembre de 2013
- Figura 11.** Fluctuación poblacional de *C. venezuelensis*, *C. limai* y *C. debilipalpis* en la Ciudad de Posadas, Misiones, entre enero y diciembre de 2013
- Figura 12.** Análisis de regresión lineal multivariada entre la humedad relativa media mensual y el número de especímenes de *C. insignis* colectados en Posadas entre enero y diciembre de 2013
- Figura 13.** Fluctuación poblacional de *C. limai* en el Municipio de Campo Grande, Misiones, entre enero y diciembre de 2015
- Figura 14.** Fluctuación poblacional de *C. insignis* y *C. paraensis* en el Municipio de Campo Grande, Misiones, entre enero y diciembre de 2015
- Figura 15.** Criaderos positivos para *Culicoides* spp.
- Figura 16.** ADN genómico total extraído a partir de *Culicoides*
- Figura 17.** A y B- Productos de amplificación de la región ITS-1 en *Culicoides* por PCR (PanCulF/PanCulR)
- Figura 18.** Productos de amplificación de la región ITS-1 de *C. insignis* por PCR (PanCulF/PanCulR)
- Figura 19.** Productos de amplificación de la subunidad I del gen mitocondrial COI para el género *Culicoides* (CulCOI F/ CulCOI R)
- Figura 20.** Alineamiento de regiones ITS-1 entre 5 especies de *Culicoides*
- Figura 21.** Productos de amplificación específica de región ITS-1 de *C. insignis* por PCR (Cul_insig F/PanCulR)
- Figura 22.** Productos de amplificación específica de región ITS-1 por PCR en larvas (Cul_insig F/PanCulR)
- Figura 23.** Árbol Neighbour-Joining basado en secuencias ITS1 de *Culicoides*
- Figura 24.** Secuencia COI de *C. insignis*

Figura 25. Árbol Neighbour-Joining basado en secuencias COI de *Culicoides*

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Departamentos, Municipios y Coordenadas Satelitales de los sitios donde se realizaron muestreos en la provincia de Misiones

Tabla II. Secuencia de cebadores utilizados para la identificación de *Culicoides*

Tabla III. Número de acceso de las secuencias ITS-1 de *Culicoides* en el GenBank

Tabla IV. Número de acceso de las secuencias COI de *Culicoides* en el GenBank

Tabla V. Especies y Subgénero de *Culicoides* colectadas en la provincia de Misiones

Tabla VI. Lugares y fechas de muestreo donde se colectaron ejemplares de *Culicoides* en la provincia de Misiones

Tabla VII. Lugares y fechas de muestreo con resultados negativos para *Culicoides* en la provincia de Misiones

Tabla VIII. Especies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) colectadas en la provincia de Misiones

Tabla IX. Especies de *Culicoides* recolectadas en la Ciudad de Posadas, Misiones, entre enero y diciembre de 2013

Tabla X. Especies de *Culicoides* recolectadas en el Municipio de Campo Grande, Misiones, entre enero y diciembre de 2015

Tabla XI. Especies, lugar, fecha, número, tipo de criadero y parámetros fisicoquímicos donde fueron colectados los estadios inmaduros de *Culicoides*

Tabla XII. Longitud y composición de bases de las secuencias ITS1 de las especies de *Culicoides* utilizadas

Tabla XIII. Cuantificación de ADN por medición de la absorbancia a 260 nm en muestras de *Culicoides*

Tabla XIV. Detalle del cebador sentido diseñado para la identificación específica de *Culicoides insignis*, incluyendo secuencia, contenido de GC y Tm (Temperatura de melting o fusión)

Tabla XV. Tabla de contingencia 2x2 para el cálculo de especificidad

Tabla XVI. Resultados obtenidos al ejecutar BlastN con la secuencia ITS-1 de *C. insignis*

Tabla XVII. Distancias genéticas interespecíficas basadas en K2P para secuencias COI de *Culicoides*

RESUMEN

La familia Ceratopogonidae comprende un grupo muy diverso de dípteros nematóceros de pequeño tamaño y de distribución cosmopolita. El género *Culicoides* Latreille es particularmente importante desde el punto de vista sanitario, y es el numéricamente mejor representado. Las especies hematófagas son eficientes vectores de enfermedades, como ser el Virus de la Lengua Azul (VLA) que ataca principalmente al ganado ovino y ruminantes silvestres y de cría causando pérdidas económicas importantes y serios daños en el animal, incluso la muerte.

La identificación morfológica de los *Culicoides* suele resultar muy tediosa además de consumir mucho tiempo debido al pequeño tamaño que presentan los ejemplares adultos, que oscilan entre 1,5 a 3 mm. Los avances moleculares aplicados a la taxonomía proveen rapidez y exactitud en la identificación de especies vectoras; el desarrollo de un método basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos para este género ofrece una posibilidad de simplificar el proceso de identificación de los *Culicoides*.

El objetivo principal de este trabajo fue contribuir al conocimiento del género *Culicoides* en la provincia de Misiones a través del empleo de herramientas moleculares y bioinformáticas. Se desarrolló un cebador sentido para la identificación de *Culicoides insignis* Lutz, considerado el principal vector del VLA en la región Neotropical, lo que permite una detección rápida y precisa de esta especie. Se aborda por primera vez en la zona el estudio de la dinámica poblacional y fluctuación estacional de *C. insignis*, estableciendo la relación entre la abundancia de dicha especie y las variables ambientales registradas en la ciudad de Posadas.

Asimismo, se identificaron los sitios de cría de *C. insignis* y otras especies de *Culicoides* que revisten importancia sanitaria. Por último, se actualiza el estado de conocimiento de especies de *Culicoides* en Misiones, se agregan 3 nuevas citas formales para la provincia de Misiones y una nueva cita para la Argentina.

Palabras claves: *Culicoides insignis*- cebador- Taxonomía Molecular

ABSTRACT

Ceratopogonidae biting midges are a small and highly diverse worldwide family. The genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) have public health importance and is numerically the best represented. Bloodsucking midges are also efficient vectors of diseases as Bluetongue Virus (BTV) in wild and domestic ruminants causing economic losses and serious damage to the animal, even the death.

Morphological identification of biting midges can be tedious and time-consuming because of their size ranging from 1.5 to 3 mm. The progress in molecular biology applied at taxonomy offer a rapid and reliable assay to identify species; so that a method based on the polymerase chain reaction (PCR) using genus-specific primers offers the opportunity of simplifying the identification process of *Culicoides* midges.

The aim of this work was contribute at knowledge of *Culicoides* genus into the province of Misiones through the use of molecular and bioinformatics tools, we developed a primer for the rapid and reliably detection of *Culicoides insignis* Lutz, the main vector of BTV in Neotropical region. The study of the population dynamics and seasonal fluctuation of *C. insignis* was carried out, establishing the relationship between the abundance of the specimens in relation to environmental variables in Posadas city.

Also, the breeding sites of *C. insignis* and other *Culicoides* species of sanitary importance were identified. Finally, the state of knowledge of *Culicoides* species in Misiones is updated: three new species of *Culicoides* are recorded for the first time from Misiones province, and one new from Argentina.

Key-words: *Culicoides insignis*- primer- Molecular Taxonomy

INTRODUCCION

La familia Ceratopogonidae comprende un grupo muy diverso de dípteros nematóceros de pequeño tamaño y de distribución cosmopolita. Algunas de sus especies son consideradas plagas que atacan al hombre y a los animales. Sin embargo, su ecología es poco conocida debido principalmente a su notable diversidad, tanto en número de especies como en las adaptaciones que éstas presentan.

Borkent (2016), en su catálogo de los Ceratopogonidae del Mundo, cita 1423 especies de *Culicoides* Latreille, 301 especies están presentes en la región Neotropical, de las cuales 266 son listadas por Borkent & Spinelli, 2007 en el catálogo de Ceratopogonidae neotropicales, y las restantes 35 fueron posteriormente descritas para esta región biogeográfica. En la Argentina fueron reportadas 44 especies (Ayala & Marino, 2018), 30 están citadas formalmente para Misiones (Borkent & Spinelli, 2007), aunque se presume que el número de especies conocidas para esta provincia podría ser inferior a su número real (Spinelli, com. pers.).

Este género es particularmente importante desde el punto de vista sanitario y es el numéricamente mejor representado. Sus especies hematófagas son eficientes vectores de enfermedades. En nuestra región *Culicoides insignis* Lutz es considerado el principal vector potencial del Virus de la Lengua Azul (VLA o BTV: “*blue tongue virus*”) que ataca principalmente al ganado ovino y rumiantes silvestres y de cría causando pérdidas económicas importantes y serios daños en el animal, pudiendo provocar incluso la muerte (Ronderos *et al.*, 2003).

La identificación taxonómica de los miembros del género *Culicoides* se ha basado casi exclusivamente en el patrón de manchas alares, genitalia de machos y hembras, y caracteres observables en los palpos y antenas (Wirth & Blanton, 1959; Spinelli *et al.*, 2005; Borkent & Spinelli, 2007). Una correcta identificación de especies es de suma importancia en la entomología médica, principalmente en estudios epidemiológicos, por lo cual cuando los caracteres morfológicos no proveen información suficiente para una correcta identificación se debe recurrir a métodos alternativos que refuercen los datos aportados por las claves taxonómicas para la identificación de especies. Los avances moleculares aplicados a la taxonomía proveen rapidez y exactitud en la identificación de especies, siendo aún más importante en el caso de aquellas especies consideradas vectoras. El desarrollo de un método basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa

(PCR) utilizando cebadores específicos para este género ofrece una posibilidad de simplificar el proceso de identificación de los *Culicoides* (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004; Stephan *et al.*, 2009). Asimismo, el aporte de nuevas herramientas desde la óptica molecular contribuirá significativamente para alcanzar una adecuada identificación específica, particularmente en el caso de las especies crípticas.

En este trabajo, *Culicoides insignis* fue caracterizado morfológica y molecularmente utilizando dos marcadores moleculares: el Espaciador Transcrito Interno 1 (ITS-1) y la subunidad I del gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa (COI).

El ITS-1 del ADN ribosomal nuclear (ADNr) tiene un gran potencial para el desarrollo de un procedimiento fiable basado en el ensayo de la PCR. Estas regiones no codificantes del ADNr nuclear son más susceptibles de acumular mutaciones y por lo tanto tienen gran interés en el estudio de identificación de especies (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004). Por otro lado, la obtención de códigos de barra o barcode constituye una herramienta diseñada que permite identificar y clasificar de forma correcta organismos tan diversos como los insectos, los cuales debido a fenómenos como la plasticidad fenotípica y la variación intraespecífica hacen compleja su identificación específica. Se basa en la premisa que esta secuencia de ADN corta y estándar puede distinguir individuos de diferentes especies, debido a que los códigos de barras presentan una variabilidad intraespecífica menor a la existente entre especies distintas (Hebert, 2003; Hajibabaei *et al.*, 2007).

A pesar de la importancia que reviste como potencial vector del VLA no hay trabajos recientes sobre ecología o dinámica poblacional de *C. insignis* en la región, tampoco hay registros de trabajos de biología molecular aplicada al estudio del género *Culicoides* en la Región Neotropical de la Argentina. Es por ello que la idea central de este trabajo fue contribuir al conocimiento de la especie *C. insignis* en la provincia de Misiones a través del empleo de herramientas moleculares y bioinformáticas

OBJETIVOS

Este trabajo de tesis se estructuró con los siguientes objetivos:

- **Objetivo Principal:**

Contribuir al conocimiento del género *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) en la provincia de Misiones a través del empleo de herramientas moleculares y bioinformáticas.

- **Objetivos Específicos:**

1. Optimizar una técnica de biología molecular y diseñar un cebador específico para *C. insignis*, principal vector del Virus de la Lengua Azul en la región Neotropical, que permita su identificación de forma rápida y precisa.
2. Obtener la secuencia barcode de *C. insignis* que complemente la correcta identificación.
3. Caracterizar los posibles criaderos de las especies de *Culicoides* presentes en los lugares de trabajo seleccionados en la provincia de Misiones.
4. Actualizar el estado de conocimiento del género en la provincia y aportar información sobre aspectos epidemiológicos, taxonómicos y ecológicos de estos vectores.

Este trabajo de Tesis consta de cinco capítulos. En primer lugar se presenta una introducción general. El primer capítulo se corresponde al marco teórico, donde se ofrece una reseña bibliográfica sobre el ciclo de vida, la importancia sanitaria, veterinaria y económica que revisten los *Culicoides*, como así también información relacionada con la identificación taxonómica de estos insectos y los marcadores moleculares más utilizados para su identificación específica. El segundo capítulo se refiere a los materiales y métodos que se emplearon en el desarrollo del trabajo a campo y las actividades llevadas a cabo en los laboratorios de entomología y biología molecular. Los capítulos tres y cuatro están destinados a la presentación de los resultados y su discusión, respectivamente. Las conclusiones, perspectivas y/o recomendaciones se presentan en el capítulo cinco. Para facilitar la lectura y comprensión del trabajo se intercalaron en el texto 25 figuras y 17 tablas. Al final del documento se encuentran las referencias bibliográficas utilizadas.

Son novedades científicas en esta tesis:

- El diseño de un cebador sentido específico para la detección de *C. insignis*, principal vector del VLA en la región Neotropical.
- Se aborda por primera vez en la zona el estudio de la dinámica poblacional y fluctuación estacional de *C. insignis* y la identificación de sus sitios de cría.
- Se establece la relación entre la abundancia de *C. insignis* y las variables ambientales registradas durante el período de muestreo en la ciudad de Posadas.
- Se realiza por primera vez la comparación de secuencias nucleotídicas y el análisis bioinformático de especies de *Culicoides* consideradas vectoras del VLA en el mundo, incluyendo a *C. insignis*.
- Por primera vez para *C. insignis* se obtiene la secuencia barcode, constituyendo el primer haplotipo mitocondrial obtenido para una especie de *Culicoides* en la región Neotropical.
- Se utiliza por primera vez en la región una metodología de genética molecular y secuenciamiento para la identificación especies de *Culicoides*, que incluye el empleo de herramientas bioinformáticas y la estandarización de un protocolo de extracción de ADN a partir de larvas individuales de *Culicoides*.
- Se actualiza el estado de conocimiento de especies de *Culicoides* en Misiones: se agregan 3 nuevas citas formales para la provincia y una nueva cita para la Argentina. Además, se provee la descripción de los adultos macho y las pupas de *Culicoides guarani* Ronderos & Spinelli y la descripción de una nueva especie de *Culicoides*.
- Se incorpora a la base de datos del GenBank las primeras secuencias nucleotídicas obtenidas para una especie de *Culicoides* presente en la región Neotropical.
- La ausencia de investigaciones de este tipo le confiere a los resultados obtenidos un valor teórico y práctico, porque contribuyen al conocimiento taxonómico y ecológico de las especies en la región, y sienta las bases para estudios de filogenia molecular entre las especies presentes en la zona.

CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1- Generalidades

Los ceratopogónidos constituyen una de las familias de dípteros nematóceros más frecuentes en la región Neotropical. Están presentes en casi todos los hábitats, desde las zonas costeras hasta las grandes elevaciones (Borkent & Spinelli, 2007). En la Argentina son conocidos vulgarmente como “polvorines” o “jejenes” (Ronderos *et al.*, 2003a).

Considerando sólo la fauna actual, esta familia se divide en cuatro subfamilias bien establecidas, basadas en relaciones filogenéticas: Leptoconopinae (2 géneros), Forcipomyiinae (2 géneros), Dasyheleinae (1 género) y Ceratopogoninae (105 géneros). La subfamilia Ceratopogoninae incluye 6 tribus: Culicoidini (3 géneros), Ceratopogonini (58 géneros), Heteromyiini (8 géneros), Sphaeromyiini (28 géneros), Palpomyiini (6 géneros) y Stenoxenini (2 géneros) (Borkent & Spinelli, 2007).

En el mundo se conocen 6.267 especies de ceratopogónidos (Borkent, 2016), 1.165 de las cuales se hallan en la región Neotropical y 227 en Argentina, sólo 46 especies se han registrado en la provincia de Misiones, 30 de las cuales corresponden al género *Culicoides* (Borkent & Spinelli, 2007) aunque se presume que el número de especies conocidas es inferior a su número real (Spinelli, com. pers.)

Muchas de estas especies son conocidas sólo por el estado adulto (especialmente las hembras) y la mayoría de las descripciones de los estados inmaduros son muy antiguas y/o incompletas (Ayala *et al.*, 2015).

Se conocen los estados inmaduros de 45 de los 111 géneros existentes de la familia Ceratopogonidae (Borkent *et al.*, 2014). En la Región Neotropical hay poca información sobre el ciclo de vida específico de los ceratopogónidos, solamente un porcentaje menor al 15 % del total de las especies citadas para la región se ha descrito en alguno de sus estados inmaduros (Ronderos & Díaz, 2002; Borkent & Spinelli, 2007).

Son holometábolos, por lo cual sufren una metamorfosis completa, pasando por los estados de huevo, larva (reconociéndose cuatro estadios larvales), pupa y adulto (Borkent & Spinelli, 2007).

En general los huevos de *Culicoides* son colocados en sustratos húmedos, ya que no son resistentes a la desecación (Spinelli & Ronderos, 2005). Son alargados y fusiformes con una longitud que oscila entre los 200 a 400 μm (Mellor *et al.*, 2000).

Las larvas (Figura 1A) tienen aspecto vermiforme, su cuerpo es blanco translúcido y presentan una cápsula cefálica de coloración amarillenta a pardo. Se desplazan con un movimiento rápido y ondulante característico (Lucientes *et al.*, 2008). Se encuentran en materia orgánica en descomposición, estiércol, frutos, epífitas, huecos de árboles, barro húmedo y en una gran variedad de otros hábitats acuáticos y/o semiacuáticos (Borkent & Spinelli, 2007).

Las pupas (Figura 1B) presentan una coloración parda o pardo-amarillenta, generalmente son lentas con movimientos circulares hasta encontrar la posición de reposo adecuada entre el sustrato o plantas flotantes sobre la superficie del agua y cuando no están alojadas contra el sustrato pueden flotar libremente o encontrarse débilmente unidas a escombros (Borkent & Spinelli, 2007).

Uno de los hábitats más comunes para el desarrollo de los estados inmaduros de *Culicoides* son los huecos de árboles. Sin embargo, el conocimiento de los sitios de cría de ceratopogónidos en fitotelmata de la Argentina es escaso, como así también el número de descripciones de estados preimaginales que fueron encontradas en este tipo de hábitat (Campos *et al.*, 2011). Los principales factores que afectan a la velocidad del desarrollo de los estados inmaduros son, además de la temperatura, los niveles de humedad, la composición química de sustrato y la densidad de los huevos (Spinelli & Ronderos, 2005; Borkent & Spinelli, 2007).

Los *Culicoides* adultos (Figura 1C) se caracterizan por su pequeño tamaño, miden de 1,5 a 3 mm de longitud, tienen el cuerpo delgado a moderadamente robusto (Lucientes *et al.*, 2008). La cabeza tiene forma esférica, con ojos compuestos grandes y reniformes. Las antenas muestran un dimorfismo sexual marcado, ya que en el macho son de tipo plumoso y en la hembra los pelos son escasos y cortos (Spinelli & Ronderos, 2005). Tienen las patas muy cortas, en estado de reposo mantienen las alas superpuestas sobre el dorso, y las mismas se pliegan sobre éste en reposo o cuando se posan sobre la piel de los animales para picar, pasando prácticamente desapercibidos (Lucientes *et al.*, 2008).



Figura 1. A- Larva; B- Pupa y C- Adulto de *Culicoides sp.*

Es muy particular en este género la morfología de sus alas, que disponen de nervaduras y celdas características y suelen presentar manchas cuya forma y disposición son útiles para clasificarlos a nivel de especie (Lucientes *et al.*, 2008). Las alas (Figura 2) se caracterizan por la presencia de una nervadura transversal radio-mediana (r-m), celdas radiales bien desarrolladas, la segunda celda radial sobrepasa la mitad del ala, la nervadura M presenta una bifurcación, y la nervadura cubital CuA se encuentra también bifurcada en la mitad del ala o más (Perruolo, 2009).

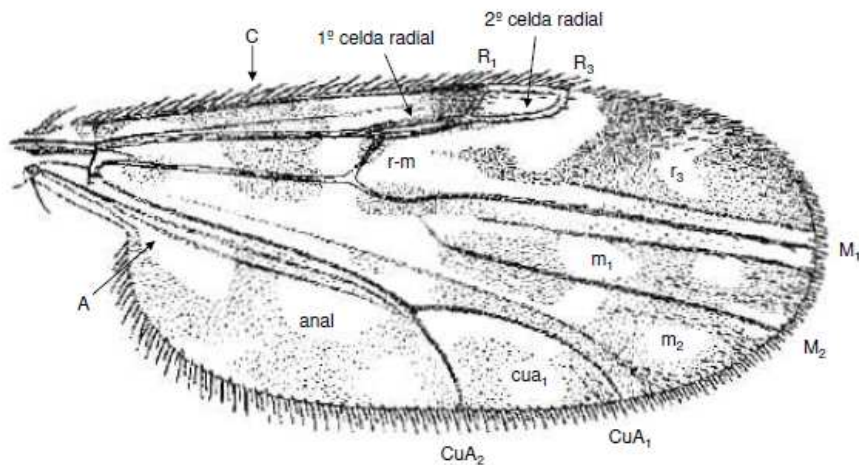


Figura 2. Ilustración del ala de una hembra de *Culicoides insignis*, (las nervaduras se indican con mayúscula y las celdas con minúscula) (Imagen tomada de Borkent & Spinelli, 2007)

El abdomen posee 10 segmentos. En el extremo distal la hembra presenta dos estructuras apendiculares cortas y redondeadas denominadas cercos abdominales (derivados apendiculares del segmento 11); en el macho los segmentos terminales IX y X se modifican para dar lugar al aparato genital articulado, que presenta forma de pinza (Spinelli & Ronderos, 2005). Los machos no se alimentan de sangre y tienen sus partes bucales reducidas, en cambio las hembras son hematófagas y presentan mandíbulas serradas. Internamente el aparato succionador está constituido por el cibario y una bomba faríngea; las mandíbulas y lacinias maxilares (ambas pares) constituyen 4 estiletes que le sirven para cortar y succionan a través del labro-epifaringe e hipofaringe (los dos estiletes restantes), por los cuales pasa el conducto alimenticio y el salival, respectivamente (Wirth & Blanton, 1989).

La mayoría de los *Culicoides* adultos son crepusculares, y por lo tanto la actividad máxima es durante el anochecer y el amanecer, y en menor medida durante la noche, aunque ciertas especies son picadoras diurnas (Lucientes *et al.*, 2008). Las hembras vuelan en búsqueda de pareja, ingesta de sangre, o un sitio donde oviponer. La distancia recorrida a través del vuelo es generalmente corta, y la mayoría de las especies se dispersan sólo unos cientos de metros de sus lugares de reproducción, y como máximo alcanzan distancias de 2 a 3 km (Mellor *et al.*, 2000).

La temperatura, hora del día, velocidad del viento, humedad del ambiente, movimiento y densidad de los huéspedes, tipo de hábitat, etc., son los principales factores que afectan el vuelo y el inicio de la alimentación de las hembras. El rango de los huéspedes es muy variado, tanto en vertebrados (mamíferos, aves, tortugas, lagartijas, anfibios) como en invertebrados (por succión de la hemolinfa de mosquitos) (Spinelli & Ronderos, 2005). Su picadura produce dolor y picazón, puede causar dermatitis severa y reacción alérgica en individuos sensibles (Ronderos *et al.*, 2003a).

1.1.1- Importancia sanitaria

Borkent (2004) ha proporcionado una lista de las enfermedades y parásitos conocidos que son transmitidos por los ceratopogónidos alrededor del mundo. Los géneros *Leptoconops* Skuse, *Forcipomyia* Meigen (solo las especies del subgénero *Lasiohelea* Kieffer) y *Culicoides* son los únicos géneros que incluyen especies cuyas hembras se alimentan de vertebrados en la región Neotropical (Spinelli *et al.*, 2005). Alrededor del mundo, los ceratopogónidos transmiten 66 virus, 15 especies de protozoarios y 26 especies de filarias. Es muy probable que muchos más permanezcan sin ser detectados. Esto sugiere fuertemente que en la región Neotropical los ceratopogónidos podrían transmitir varios organismos además de los 6 virus y 8 nemátodos actualmente conocidos (Borkent & Spinelli, 2007).

La **filariasis** es una enfermedad causada por el nematodo *Mansonella ozzardi* (Manson). En la Argentina los focos de mansonelosis están restringidos al noroeste del país, particularmente en las provincias de Tucumán y Jujuy. Sus vectores incluyen especies de Simuliidae y de Ceratopogonidae, entre los ceratopogónidos *C. lahillei* (Iches) es considerado el vector principal, mientras que *C. paraensis* (Goeldi) se comporta como vector secundario (Shelley & Coscaron, 2001; Ronderos *et al.*, 2003a; Veggiani Aybar *et al.*, 2012).

Más allá de la mansonelosis, la importancia sanitaria de los *Culicoides* en la región Neotropical se centra en dos problemas principales: el Virus de la fiebre Oropuche en el hombre y el Virus de la Lengua Azul (“*blue tongue virus*”) en los animales (Ronderos *et al.*, 2003a; Borkent & Spinelli, 2007; Cazorla Perfetti, 2014).

El **virus Oropuche** (OROV), perteneciente a la familia Bunyaviridae, se halla antígenicamente incluido en el serogrupo Simbú. Es una de las enfermedades por

arbovirus más importantes en las Américas (Mellor *et al.*, 2000), y es el agente etiológico más importante de una enfermedad humana vehiculizado por una especie de Ceratopogonidae (Ronderos *et al.*, 2003a).

Los brotes por virus Oropouche registrados en los últimos diez años han tenido lugar principalmente en la región amazónica. Se han registrado brotes en zonas urbanas de Brasil, Perú, Panamá y Trinidad y Tobago (PAHO, 2010).

En la región Neotropical, *C. paraensis* (Goeldi) está implicado en la transmisión de este virus (Ronderos *et al.*, 2003a; Borkent & Spinelli, 2007; Mourão *et al.*, 2009). Aunque también presenta un ciclo selvático, los brotes epidémicos ocurren principalmente en zonas urbanas donde la población de *C. paraensis* ocurren en grandes densidades (Mellor *et al.*, 2000; Borkent & Spinelli, 2007).

El **Virus de la Lengua Azul** (BTV) es una enfermedad viral, no contagiosa que afecta principalmente al ganado ovino y rumiantes silvestres y de cría, causando serios daños y provocando incluso la muerte del animal, lo que origina pérdidas económicas importantes (Ronderos *et al.*, 2003a). Es perteneciente al género *Orbovirus* de la familia Reoviridae, que se caracterizan por presentar un genoma de ARN de doble cadena cuya replicación se produce exclusivamente en el citoplasma (Holmes *et al.*, 1995).

La enfermedad de la Lengua Azul se encuentra en la lista A de la Oficina Internacional Epizootias (OIE) (Ronderos *et al.*, 2003a; MacLachlan, 2004). En esta lista se encuentran aquellas enfermedades con gran poder de difusión y especial gravedad, que pueden extenderse más allá de las fronteras nacionales, y tienen consecuencias socioeconómicas y sanitarias graves y cuya incidencia en el comercio internacional de animales y productos de origen animal es muy importante (MacLachlan, 2011).

Se distribuye aproximadamente entre las latitudes 40°N y 35°S, dentro de la cual se encuentran 11 de los 13 países de Sudamérica (Lager, 2004a). Hasta el momento se conocen 24 serotipos diferentes, todos ellos transmitidos únicamente por especies del género *Culicoides* (Ronderos *et al.*, 2003a). Algunos autores recomiendan tratar esta enfermedad como si fuera en realidad 24 enfermedades diferentes, puesto que los síntomas, las lesiones, la morbilidad y mortalidad varían considerablemente de un serotipo a otro. La especificidad en la transmisión de la enfermedad se debe a que estos insectos hematófagos poseen en la pared de su intestino medio unos receptores específicos que en contacto con las partículas víricas ingeridas activan el proceso de

fagocitosis permitiendo el paso a través de las células intestinales, favoreciendo la multiplicación activa a ese nivel y su posterior diseminación a través de las glándulas salivales, donde se almacenan para salir junto con la saliva en las posteriores ingestas de sangre. A pesar de que se desarrollan en otros órganos internos, no pasan al ovario por lo que no hay transmisión transovárica, por lo tanto para que una hembra se infecte tiene siempre que haber ingerido sangre de un animal virémico (Lucientes *et al.*, 2008). En consecuencia, su distribución mundial se restringe a las zonas donde están presentes los vectores y la transmisión de la enfermedad se limita a aquellos momentos del año donde estos insectos presentan mayor actividad. Se ha demostrado que las tasas de infección del BTV y las tasas de virogénesis dentro de las especies de *Culicoides* consideradas vectoras son dependientes de la temperatura; con temperaturas elevadas las tasas de infección fueron mayores y las tasas de virogénesis más rápidas, y la transmisión se produce antes (Mellor *et al.*, 2000).

Las lesiones de la lengua azul en el ganado ovino han sido bien descritas, e incluyen erosiones orales y úlceras, cojera, coronitis, debilidad, depresión, edemas y hemorragia como consecuencia de una lesión vascular mediada por virus (MacLachlan, 2004). Generalmente el cuadro varía desde una enfermedad subclínica hasta una respuesta febril aguda con congestión y edema facial, donde la boca y narinas se hinchan y lesionan produciendo úlceras que pueden escararse, lo que causa un intenso dolor y la consecuente dificultad para alimentarse. Frecuentemente la lengua puede protruir fuera de la boca y tomar una coloración azulada (cianosis), a lo que debe el nombre el virus y la enfermedad, mientras que las pezuñas se inflaman y enrojecen, pudiendo llegar a desprenderse. En casos menos graves se verifica ptialismo e hiperemia de la mucosa oral. En muchos animales se observa enrojecimiento de la piel, generalmente iniciada en la cabeza, y que puede extenderse a todo el cuerpo. Es común que los animales más afectados permanezcan con su cabeza y cuello hacia un lado, y con el dorso arqueado, perdiendo la capacidad de permanecer parados (Ronderos *et al.*, 2003a).

Aunque la infección por BTV de los rumiantes es a menudo subclínica o con síntomas ligeramente perceptibles, la infección también puede conducir a la enfermedad grave con alta mortalidad en los animales susceptibles (Ronderos *et al.*, 2003a; MacLachlan, 2011).

La especie del vector varía según la zona geográfica y el serotipo actuante, en la región Neotropical los principales vectores son *C. insignis*, *C. pusillus* Lutz y posiblemente *C. filarifer* Hoffman (Mellor *et al.*, 2000; Borkent & Spinelli, 2007).

En relación a *C. insignis*, Tanya *et al.* (1992), demostraron con una serie de experimentos en el laboratorio la capacidad de infección y replicación del BTV en dicha especie. Además, evidenciaron la capacidad de transmisión del virus a animales susceptibles. Por otro lado, el virus de la lengua azul fue aislado a partir de *C. pusillus* en América Central y en el Caribe (Lager, 2004a); debido a que la distribución de esta especie abarca desde México hasta el noreste de la Argentina (Wirth & Blanton, 1959) podría actuar también como vector del virus en América del Sur (Borkent & Spinelli, 2007)

En América del Sur casi todos los países tienen evidencia serológica de infección por virus de la lengua azul pero sólo se han descrito cuatro brotes de la enfermedad (Gibbs & Greiner, 1994; Lager, 2004a; Portela Lobato *et al.*, 2015).

Según el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) la enfermedad clínica nunca ha sido reportada en la Argentina. Sin embargo, se detectó actividad viral y el virus fue aislado en rodeos bovinos centinelas. La distribución de la enfermedad en nuestro país se encuentra restringida a la provincia de Misiones y a los Departamentos de Santo Tomé e Ituzaingó de la provincia de Corrientes (SENASA, Manual de procedimientos, 2004; Veggiani *et al.*, 2011). En datos aparecidos en las Informaciones Sanitarias de la Oficina Internacional de Epizootias, Organización Mundial de la Salud Animal (OIE, 2001), se informa del aislamiento del virus en el Noreste de la Argentina, en ese caso en bovinos con infecciones asintomáticas de los departamentos de Ituzaingó y Santo Tomé en la provincia de Corrientes (Lager, 2004a). Asimismo, en 10 Departamentos de la provincia de Misiones se detectaron animales con anticuerpos para el virus (Ronderos *et al.*, 2003a). Datos recientes dan cuenta de que el serotipo circulante en la Argentina fue identificado como serotipo 4 (Ronderos *et al.*, 2003a; Lager, 2004b; Legisa *et al.*, 2013, Portela Lobato *et al.*, 2015).

Culicoides insignis (Figura 3) es una de las especies más abundantes en la Argentina, está frecuentemente asociada al ganado vacuno (Ronderos *et al.*, 2003a) y si bien es el vector predominante en nuestra zona (Ronderos *et al.*, 2003a; Gorch *et al.*, 2002; Lager, 2004b; Portela Lobato *et al.*, 2015) la información disponible hasta el momento es

insuficiente para excluir la posibilidad de que especies adicionales de *Culicoides* también puedan transmitir el virus, esto se debe a que el virus no fue aislado todavía desde potenciales vectores de la región (Ronderos *et al.*, 2003a).



Figura 3. Ejemplar hembra de *Culicoides insignis*

1.1.2- Dermatitis y Dermatozoonosis

Las hembras del género *Culicoides* son importantes en Salud Pública por la molestia que ocasionan sus picaduras, las cuales suelen ser irritantes y dolorosas, y por provocar lesiones dérmicas y alergias (Ronderos *et al.*, 2003a; Borkent & Spinelli, 2007), lo que ocasiona muchas veces pérdidas económicas significativas en sectores involucrados con actividades recreativas y turísticas, forestales y agropecuarias (Santamaría *et al.*, 2008; Cazorla Perfetti, 2014).

De las 266 especies de *Culicoides* reportadas por Borkent & Spinelli (2007) para la región Neotropical, 70 de ellas presentan carácter antropofílico, de las cuales solo las siguientes especies representan un problema para las poblaciones humanas al presentarse en un número considerable: *C. furens* (Poey) y *C. phlebotomus* (Williston) en las zonas costeras de Centro América y parte norte de Sudamérica; *C. maruim* Lutz en la zona costera de Brasil; *C. insinuatus* Ortiz & Leon, *C. puracensis* Wirth & Lee en las altas elevaciones de los Andes Colombianos; *C. pseudodiabolicus* Fox y *C.*

paraensis en la cuenca Amazónica; *C. lahillei* y *C. debilipalpis* Lutz en Paraguay y noreste de Argentina; *C. caridei* (Brethes) en Uruguay y la provincia de Buenos Aires, Argentina; y *C. patagoniensis* Ronderos & Spinelli en la Patagonia argentina y chilena (Borkent & Spinelli, 2007).

Dependiendo del grado de sensibilidad de las personas a los componentes de la saliva de estos insectos, las picaduras (Figura 4) pueden causar reacciones inmediatas o tardías que van desde dermatitis alérgicas, pápulas y pústulas producto de sobre infección por rascado, hasta reacciones más severas como los eczemas dérmicos, descamación y cicatrices con alteración en la pigmentación de la piel (Ronderos *et al.*, 2003a).



Figura 4. Dermatitis causada por picaduras de *Culicoides* spp.
(Imagen tomada de Santamaría *et al.*, 2008)

1.1.3- Importancia biológica y económica

Las hembras de la mayoría de las especies de la tribu Ceratopogoninae son depredadores de insectos de menor talla, mientras que ciertas especies de los géneros *Atrichopogon* Kieffer y *Forcipomyia* Meigen son ectoparásitos de insectos de mayor talla, debido a que se alimentan de hemolinfa. Algunas especies de *Forcipomyia* y *Dasyhelea* Kieffer, son polinizadoras que se alimentan exclusivamente de néctar, por lo que poseen importancia tanto biológica como económica en la polinización de plantas de interés agrícola como el cacao (*Theobroma* spp.) y el caucho (*Hevea* spp.); otras especies de ceratopogónidos polinizan plantas de América tropical como ser mango (*Mangifera* spp.) y algunas palmeras (Borkent & Spinelli, 2007).

Culicoides paraensis se alimenta de varias plantas de bromelias, cacao, caucho y banana, donde podrían estar cumpliendo un papel importante como polinizadores (Wirth & Blanton, 1959; Borkent & Spinelli, 2007).

Por otro lado, los estados inmaduros que habitan en reservorios de agua (*e.g.*, ríos, lagos) son utilizados, junto a otros taxa de macroinvertebrados, como bioindicadores en la evaluación de la calidad del agua, especialmente en aquellas fuentes hídricas que se emplean para el abastecimiento de las poblaciones humanas (Cazorla Perfetti, 2014). Algunas especies son predadoras de microorganismos o larvas de otros insectos, y posiblemente cumplan un rol como controladores biológicos sobre los estados inmaduros de otros insectos (Borkent & Spinelli, 2007).

1.1.4- Otros

La **leishmaniasis** es una enfermedad altamente prevalente en el NOA y el NEA (Gould *et al.*, 2013). Puntualmente en la provincia de Misiones se determinaron 3 escenarios de transmisión de leishmaniasis cutánea (LC) y visceral (LV), correspondientes a 3 períodos: 1929-1997, en el que se constató la transmisión de LC dispersa en el tiempo y espacio; 1998-2005, en el que hubo brotes focales de LC; y 2006-2014 en el que, además, se registraron brotes y se documentó la dispersión geográfica de la LV (Salomón *et al.*, 2016).

En base a recientes publicaciones sería necesario corroborar en nuestro país la capacidad de infección natural de ceratopogónidos con *Leishmania* spp.. Slama *et al.* (2014) detectaron ADN de *Le. donovani* y de *Le. infantum* en *Culicoides* spp. infectados naturalmente en India y África, respectivamente. Asimismo, en el estado de Maranhão, en Brasil, se reportó la presencia de ADN de *Le. braziliensis* en *C. foxi*, *C. ignacioi* y *C. insignis*; y ADN de *Le. amazonensis* en *C. filariferus* y *C. flavivenula*. Estas especies de *Leishmania* son reconocidos agentes etiológicos de la LC (Rebêlo *et al.*, 2016).

En Australia, Dougall *et al.* (2011) reportó la infección natural con *Leishmania* spp. en especímenes de *Forcipomyia* Meigen, pertenecientes al subgénero *Lasiohelea* Kieffer. Estos resultados constituyen la primera evidencia de un vector “alternativo” transmisor de leishmaniasis que no es un flebótomo (Diptera: Psychodidae) (Dougall *et al.*, 2011). Estos hallazgos tienen implicaciones considerables en la comprensión del ciclo de vida de *Leishmania* en todo el mundo (Slama *et al.*, 2014; Seblova *et al.*, 2014).

Por otro lado, nuevas investigaciones realizadas en el suroeste de Alemania indican que los *Culicoides* también serían susceptibles a la infección por parásitos *Plasmodium* spp., lo cual implicaría que los parásitos de animales silvestres puedan ser transferidos a los

humanos a través de las picaduras de estos dípteros hematófagos (Santiago-Alarcón *et al.*, 2012).

La generalidad al momento de alimentarse puede llevar a la emergencia de nuevas enfermedades (Santiago-Alarcón *et al.*, 2012); razón por la cual es indispensable demostrar experimentalmente la viabilidad de los *Culicoides* como posibles vectores de estas y otras enfermedades (Slama *et al.*, 2014; Seblova *et al.*, 2014, Rebêlo *et al.*, 2016) especialmente en áreas endémicas para leishmaniasis y malaria.

1.2- Taxonomía y marcadores moleculares aplicados en *Culicoides*

1.2.1- Taxonomía

La Taxonomía es la disciplina encargada de la clasificación de los organismos en un sistema de categorías jerárquicas, basado en caracteres informativos que intentan reflejar las relaciones filogenéticas que existen entre ellos. Durante más de dos siglos, esta ciencia se basó principalmente en el uso de caracteres morfológicos para distinguir especies y otras categorías taxonómicas, mientras que en la actualidad la taxonomía integra técnicas morfológicas, ecológicas, etológicas y moleculares, y responde a múltiples preguntas (Noriega *et al.*, 2015).

El uso de la morfología en la clasificación de especies puede resultar insuficiente en el caso de especies crípticas o en estados inmaduros no descriptos; asimismo el hallazgo de huevos, larvas y/o pupas disociados de ejemplares adultos dificulta la identificación a partir de rasgos morfológicos (Lanteri, 2007), en tanto no puedan ser relacionados a un ciclo de vida de una especie en particular.

La clasificación de las especies de *Culicoides* se ha basado en la observación de caracteres morfológicos como ser el patrón de manchas alares, genitalia y caracteres observables en los palpos y antenas (Wirth & Blanton, 1959; Spinelli *et al.*, 2005; Borkent & Spinelli, 2007). Debido a la similitud morfológica que presentan algunas especies de este género, y que comúnmente son simpátricas, es fundamental contar con métodos alternativos que refuercen los datos aportados por las claves taxonómicas para la identificación de *Culicoides* (Stephan *et al.*, 2009).

La **taxonomía molecular** consiste en la clasificación de los organismos en base a proteínas o ácidos nucleicos, en lugar de caracteres morfológicos. Los avances moleculares aplicados a la taxonomía proveen rapidez y exactitud en la identificación de

especies vectoras; una de las técnicas comúnmente utilizados es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El objetivo principal al utilizar esta técnica para taxonomía es la identificación de regiones blanco del genoma que contienen secuencias específicas de especie, las cuales son posteriormente secuenciadas con el fin de conocer cual es su composición de bases, y de esta manera diseñar cebadores específicos que hibriden sobre estas regiones y permitan identificar las distintas especies (Black & Munstermann, 1996).

Una correcta identificación específica es absolutamente indispensable para encarar cualquier tipo de investigación ecológica o epidemiológica (Venter *et al.*, 2009). Cuando la/s especies/s son relevantes desde el punto de vista sanitario humano y/o animal, realizar muestreo sistematizado de las mismas en una determinada región permitirá definir áreas de distribución de estas especies facilitando el diseño e implementación de medidas de control.

1.2.2- ADN Ribosomal Nuclear y Espaciadores Transcriptos Internos (ITS)

El ADN ribosómico (ADNr), que codifica el ARNr constituye una familia de genes muy bien estudiado, cuya estructura es conocida en una amplia variedad de eucariotas, incluyendo muchas especies de insectos (Collins & Paskewitz, 1996)

El locus del ADNr (Figura 5) contiene copias repetidas en tándem (500 a 700 repeticiones por genoma) de una unidad transcripcional que contiene tres regiones génicas (18S, 5.8S y 28S). Las secuencias de estos genes están separadas por dos espaciadores que se transcriben. El espaciador externo (ETS) está localizado aguas arriba del gen 18S, mientras que el primer espaciador transcrito interno (ITS-1) y el segundo espaciador (ITS-2) están localizados entre los genes 18S y 5.8S, y entre 5.8S y 28S respectivamente (Collins & Paskewitz, 1996, Cêtre-Sossah *et al.*, 2004)

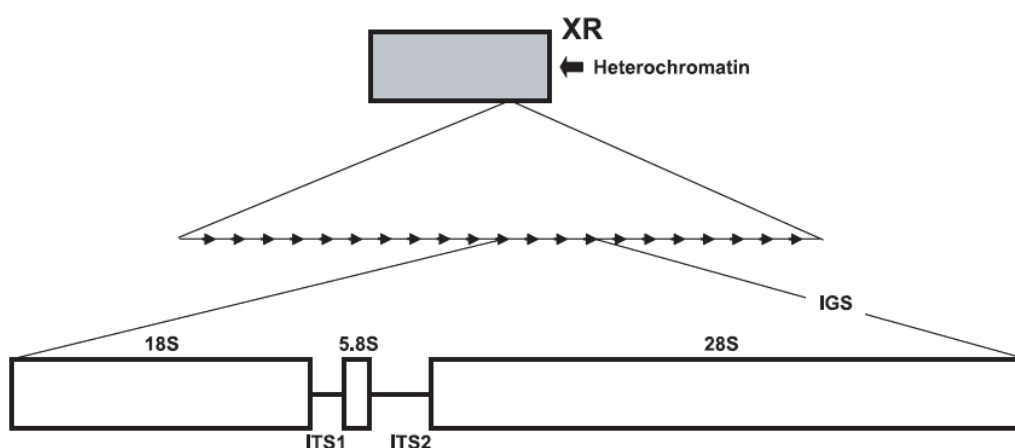


Figura 5. Localización y organización del ADN ribosomal (ADNr)
(Imagen de Cêtre-Sossah *et al.*, 2004)

Las secuencias de los genes del ADNr nuclear están altamente conservadas y evolucionan muy lentamente; constituyen así herramientas importantes para el estudio sistemático y la inferencia de relaciones filogenéticas entre taxones (Elder & Turner, 1995; Collins & Paskewitz, 1996). El diseño de cebadores universales para PCR dentro de zonas altamente conservadas de genes ADNr ha permitido amplificar las regiones ITS-1, ITS-2 e IGS en un amplio rango de organismos, por lo cual el ITS-1 del ADN ribosomal nuclear tiene un gran potencial para el desarrollo de un procedimiento fiable basado en el ensayo de la PCR (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004; Stephan *et al.*, 2009).

Estas regiones no codificantes del ADNr nuclear (ITS-1, ITS-2 e IGS) son más susceptibles de acumular mutaciones y por lo tanto tienen gran interés en el estudio de identificación de especies (Elder & Turner, 1995; Collins & Paskewitz, 1996).

1.2.3- ADN mitocondrial y códigos de barra o barcode

El genoma mitocondrial (Figura 6) se diferencia del genoma nuclear en características como el número de copias, el tamaño, la organización, la herencia y el código genético (Bejarano, 2001). En los insectos, está constituido por una sola molécula circular de ADN de doble cadena, con una longitud aproximada de 16 kb. Posee 13 genes que codifican proteínas involucradas en el transporte de electrones y fosforilación oxidativa, representados por 3 subunidades del complejo citocromo c oxidasa (COI, COII, COIII), 2 subunidades de la ATPasa (ATPasa 6, ATPasa 8), 7 subunidades complejo NADH

grupos taxonómicos, su alta tasa de sustitución por carecer de reparasas y la facilidad con la que se puede aislar y manipular (Harrison, 1994; Lunt *et al.*, 1996).

Además, el gen que codifica la subunidad I del citocromo oxidasa COI tiene dos importantes ventajas. En primer lugar, los cebadores universales para este gen son altamente conservados, y han sido diseñados para cubrir todo el gen COI amplificando regiones de diferentes variabilidades lo que permite la recuperación de su extremo 5' en la mayoría de los filos animales. En segundo lugar, COI posee un mayor rango de evidencias filogenéticas que cualquier otro gen mitocondrial. En común con otros genes que codifican proteínas, sus nucleótidos en tercera posición muestran una alta incidencia de sustituciones de bases, que conduce a una tasa de evolución molecular que es aproximadamente tres veces mayor que la de 12S o 16S del ADNr (Hebert *et al.*, 2003).

El barcoding constituye una herramienta diseñada para identificar de forma rápida y precisa las especies a partir de una secuencia de ADN corta y estándar. Se basa en la premisa de que este fragmento de ADN pueda distinguir individuos de diferentes especies, debido a que los códigos de barras presentan una variabilidad intraespecífica menor a la existente entre especies distintas (Hebert *et al.*, 2003; Hajibabaei *et al.*, 2007).

El genoma mitocondrial de los animales constituye un objetivo óptimo para el análisis genético, en comparación al genoma nuclear, debido a su falta de intrones, la exposición limitada a recombinación y su modo de herencia haploide; además que las secuencias COI son fáciles de alinear y simples de analizar ya que los eventos de inserción-delección son poco frecuentes en este gen (Hebert *et al.*, 2003).

De acuerdo con Ander *et al.* (2012), el uso de códigos de barras como una herramienta para la identificación de las especies de *Culicoides* puede diferenciar 95% de las especies estudiadas. El gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) es el marcador molecular secuenciado más comúnmente usado para estudios de rutina de *Culicoides* (Augot *et al.*, 2013; Slama *et al.*, 2014), siendo considerado actualmente como la “carta dorada” en la identificación de organismos.

Hasta la fecha no hay registros de estudios de biología molecular aplicados a los *Culicoides* presentes en la región Neotropical de Argentina, por lo cual este trabajo representa el primer aporte de taxonomía molecular en este grupo de dípteros.

Al incorporar herramientas de biología molecular a la identificación de especies de *Culicoides* no se pretende sustituir la taxonomía clásica. Por el contrario, consideramos que la adecuada combinación de estas herramientas aplicadas a la clasificación permitirá un mejor conocimiento de las especies, en particular de aquellas consideradas vectoras de enfermedades y su patrón de transmisión de patógenos.

CAPITULO 2. MATERIALES Y METODOS

2.1- Área de estudio

Misiones, desde el punto de vista fitogeográfico, se encuentra incluida dentro de la Provincia Subtropical Oriental. Esta denominación, propuesta por Cabrera (1953) y aceptada por Martínez Crovetto (1963), abarca parte del sudeste de Brasil, este del Paraguay y nordeste de Argentina.

Esta provincia presenta en Argentina dos formaciones fitogeográficas bien diferenciadas en distritos: el distrito de las selvas mixtas o Selva Paranaense (también denominada Selva Misionera) y el distrito de los Campos. La selva es densa, hidrófila, semidecidua, de gran diversidad y de extraordinaria variedad florística. En su forma natural, sus árboles más altos superan los 40 metros de altura. Allí se forman estratos de vegetación con formaciones herbáceas de hasta 3 metros en el estrato herbáceo, árboles de mayor estatura en el estrato arbustivo –de 3 a 10 metros-, y arboledas de entre 10 y 20 metros (dosel) en conjunto con una floresta de más de 20 metros de altura en el estrato emergente. Así se mezclan la Araucaria (*Araucaria angustifolia*), el Palo Rosa (*Aspidosperma polyneuron*) y otros árboles de gran talla como el guatambú blanco, laurel negro y cedro, con toda una diversidad de flora de plantas epífitas, lianas y trepadoras, los diferentes helechos arborescentes y las tacuaras o bambúes. El ecosistema de los campos ocupa la franja sur de la provincia y alberga dos ambientes: uno de selva baja, con árboles de menor fuste que los de la Selva Paranaense, en donde se destacan principalmente, el Urunday (*Astronium balansae*), árbol típico y predominante, así como el Tataré (*Pitecellobyum scalare*), el Aguaribay (*Schinus molle*), el Curupay (*Anadenanthera macrocarpa*), la Chichita (*Lithraea molleoides*) y las formaciones de pastos bajos (*Aristida jubata*, *Andropogon lateralis*). En este ecosistema alternan isletas de montes y a su vez, el bosque se presenta en forma de galería, siguiendo los cursos de agua. Existen selvas bajas, más o menos continuas, en los cerros arnesetados y a orillas de los arroyos que surcan el sur misionero. Los pastizales del sur misionero presentan diversos microambientes: pastizales hidrófilos (ambientes extremadamente húmedos), pastizales mesófilos (ambientes semihúmedos) y comunidades pioneras o afloramientos de basaltos (ambientes extremadamente secos)

(Martínez Crovetto, 1963; Cabrera, 1971; Stefañuk, 2009; Gran Atlas de Misiones, 2012).

2.2- Recolección e identificación de especímenes adultos

La captura de especímenes se realizó durante el período comprendido entre enero de 2013 y diciembre de 2016 en la provincia de Misiones.

Se estimó la riqueza específica en 2 puntos de la provincia: en la ciudad de Posadas del Departamento Capital; y en Campo Grande dentro del Departamento Cainguaés (Figura 7). En la ciudad de Posadas se trabajó en el Centro de Investigaciones Entomológicas radicado en el Parque Tecnológico Misiones, donde se realizó un muestreo mensual durante 12 meses comprendidos entre enero y diciembre de 2013, mientras que en el Municipio de Campo Grande el trabajo a campo se realizó en un domicilio particular ubicado en una zona rural entre enero y diciembre de 2015.



Figura 7. Trampa de luz tipo CDC y sitios de instalación

(Imagen a la izquierda: Centro de Investigaciones Entomológicas-PTMi en la ciudad de Posadas; a la derecha: Domicilio particular en zona rural de Campo Grande; al centro: Trampa de luz tipo CDC)

El trabajo a campo abarcó la mayor parte posible de territorio provincial, para ello se realizó un muestreo mensual en puntos aleatorios de la provincia donde se relevó las especies presentes y los diferentes sitios de cría. La Tabla I detalla los sitios donde se realizaron los muestreos para coleccionar *Culicoides*.

Tabla I. Departamentos, Municipios y Coordenadas Satelitales de los sitios donde se realizaron muestreos en la provincia de Misiones.

Departamento	Municipio	Lugar de muestreo	Coordenadas geográficas
General Manuel Belgrano Iguazú	Comandante Andresito Puerto Iguazú	Domicilio particular	26° 53' 36,5" S 53° 52' 42,5" W
		Domicilio particular	25° 35' 42,2" S 54° 35' 19,2" W
Eldorado	Eldorado	Arroyo Pomar- Ruta Nacional N° 12	26° 25' 23" S 54° 34' 48" W
Eldorado	Eldorado	Arroyo Paticuá	26° 23' 54" S 54° 38' 4" W
Eldorado	Eldorado	Salto Küppers	26° 23' 12" S 54° 40' 54" W
Eldorado	Eldorado	Domicilio particular	26° 24' 31,5" S 54° 36' 25,1" W
Eldorado	Colonia Victoria	Puerto Victoria	26° 20' 0,4" S 54° 39' 43" W
Eldorado	Colonia Delicia	Arroyo Aguaray Miní	26° 12' 40" S 54° 36' 56" W
San Pedro	San Pedro	Parque Provincial Esmeralda- Reserva Biosfera Yabotí	26° 53' 36,5" S 53° 52' 42,5" W
Montecarlo	Montecarlo	Domicilio particular. Museo Loma Alta	26° 34' 01" S 54° 45' 57" W
Libertador Gral San Martín	El Alcázar	Camping Paranay	26° 43' 02" S 54° 48' 49" W
Cainguás	Campo Grande	Domicilio particular	27° 12' 28" S 54° 58' 48" W
Oberá	Oberá	Salto Krysiuk	27° 34,9' 34" S 55° 9' 41,4" W
Oberá	Campo Viera	Arroyo Macuco	27° 02' 45,1" S 54° 40' 50,8" W
Oberá	Campo Ramón	Arroyo Ramón	27° 28' 10,5" S 55° 02' 7,5" W
Leandro N. Alem	L.N. Alem	Colonia Yermal Viejo	27° 36' 25,9" S 55° 19' 15" W
Apostoles	San José	Domicilio particular	27° 46' 11" S 55° 46' 49" W

Continuación Tabla I.

Departamento	Municipio	Lugar de muestreo	Coordenadas geográficas
Candelaria	Candelaria	Club UPCN	27° 29' 2,5" S 55° 44' 18" W
Candelaria	Profundidad	Arroyo Profundidad Parque Provincial Cañadón de Profundidad	27° 55,8' 33,7" S 55° 70,9' 21,9" W
Candelaria	Santa Ana	Domicilio particular	27° 21' 0,5" S 55° 36' 01" W
Capital	Fachinal	Arroyo Zanabria	27° 43' 19" S 55° 42' 15,1" W
Capital	Fachinal	Domicilio particular	27° 38' 15,5" S 55° 44' 47,2" W
Capital	Fachinal	Arroyo Liso- Ruta 105	27° 40' 28,3" S 55° 37' 12,9" W
Capital	Garupá	Domicilio particular	27° 28' 47" S 55° 49' 39" W
Capital	Garupá	Estancia "Santa Inés"	27° 31' 40,9" S 55° 51' 59,4" W
Capital	Garupá	Camping Privado: "El Lago"	27° 28' 47" S 55° 49' 39" W
Capital	Posadas	Domicilio particular	27° 21' 43,4" S 55° 55' 52,7" W
Capital	Posadas	Campus Universitario UNAM	27° 25' 59,70" S 55° 53' 35,67" W
Capital	Posadas	Reserva - Area de Recursos Ambientales El Caimán	27° 26' 11,0" S 55° 53' 47,4" W
Capital	Posadas	Arroyo Caimán	27° 25' 47,9" S 55° 53' 57,4" W
Capital	Posadas	Arroyo Itá	27° 21' 35,3" S 55° 54' 36,4" W
Capital	Posadas	Arroyo Antonica	27° 21' 48" S 55° 56' 32,6" W
Capital	Posadas	Domicilio particular	27° 38' 13" S 55° 29' 41" W

Para la captura de ejemplares adultos de *Culicoides* se trabajó con trampas de luz tipo CDC (Figura 7) instaladas en cada uno de los puntos de muestreo seleccionados. En cada sitio de muestreo la trampa se colocó a una altura aproximada de 1,50 m por encima del suelo y funcionó desde las 18:00 h hasta las 7:00 h durante 2 noches

seguidas. Asimismo, en determinados sitios de muestreo, la colecta de adultos se realizó además con redes y por captura directa manual a través de cebo humano.

En el laboratorio se procedió a separar los dípteros pertenecientes a la familia Ceratopogonidae del resto de los insectos. Posteriormente se identificó a los ejemplares del género *Culicoides* mediante la utilización de las claves dicotómicas propuestas por Wirth & Blanton (1959), Spinelli *et al.* (2005) y el Atlas de caracteres alares de Wirth *et al.*, (1988), asimismo se trabajó con descripciones originales y se comparó con ejemplares depositados en la División Entomología del Museo de La Plata (MLP). La mayoría de los especímenes se montó entre porta y cubreobjetos con bálsamo de Canadá para su examinación con microscopio óptico convencional, siguiendo la técnica propuesta por Borkent & Spinelli (2007). Una vez identificados taxonómicamente todos los ejemplares se calculó la abundancia relativa ($pi = ni/N$) de cada especie colectada.

2.3- Análisis del efecto de las variables climáticas en poblaciones de *C. insignis* en la ciudad de Posadas

Se analizó la abundancia de los ejemplares colectados de *C. insignis* en relación a las variables ambientales registradas en la ciudad de Posadas mediante regresión lineal múltiple.

Se trabajó con las siguientes variables climáticas: temperatura media mensual, temperatura mínima media mensual, temperatura máxima media mensual, precipitación acumulada mensual y humedad relativa media mensual. La estación meteorológica Posadas del Servicio Meteorológico Nacional (SMN) aportó los datos registrados para cada una de las variables consideradas en la ciudad de Posadas durante el período comprendido entre enero y diciembre de 2013.

Se consideró a la abundancia de *C. insignis* como variable dependiente y como variables independientes a las variables climáticas mensuales. Para este análisis la ecuación general para el modelo desarrollado fue $y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_nx_n$ donde y corresponde a la abundancia de *C. insignis*; a_0 es una constante y $a_1 \dots a_n$ son los coeficientes de las diferentes variables climáticas (x_1 a x_n). Se designó de la siguiente manera a las variables climáticas: x_1 --temperatura media mensual, x_2 --temperatura mínima media mensual, x_3 --temperatura máxima media mensual, x_4 --precipitación acumulada mensual y x_5 --humedad relativa media mensual.

La regresión lineal multivariada se realizó con el programa libre Infostat, version 2017e (Di Rienzo *et al.*, 2008). La significancia estadística de cada variable se testeó a través del procedimiento de Selección Paso a Paso mediante la retención de variables.

2.4- Colecta de estados inmaduros y caracterización de criaderos

Se realizó también la búsqueda de estados inmaduros de *Culicoides*, para ello se identificó posibles criaderos teniendo en cuenta los principales factores que favorecen el desarrollo de estos dípteros, como ser la humedad y presencia de materia orgánica (Figura 8).



Figura 8. Búsqueda de estados inmaduros de *Culicoides* spp

De acuerdo al tipo de criadero la colecta de los ejemplares se realizó directamente con pipetas plásticas, como en el caso de la fitotelmata, o con bandejas plásticas para la toma de muestras en cuerpos de agua de mayor tamaño. En todos los casos se utilizó la técnica de solución saturada de azúcar (Uslu & Dik 2006). Cuando la colecta se realizó

a partir de tierra húmeda, excremento o materia orgánica depositada en el suelo se procedió a medir con una regla la profundidad a la cual se tomaron las muestras.

Además, para la caracterización de los criaderos positivos se procedió a medir los siguientes parámetros fisicoquímicos: temperatura, oxígeno disuelto, conductividad y pH.

Debido a que la mayoría de las especies de la región han sido descritas sobre la base del estado adulto, y como los estados inmaduros aun son desconocidos en su gran mayoría, las larvas y/o pupas colectadas no se identificaron a nivel específico a partir de los caracteres morfológicos observados; por lo tanto, en todos los casos, se criaron en el laboratorio hasta la emergencia de los adultos para confirmar su identificación.

2.5- Cría de estados inmaduros de *Culicoides* en el laboratorio: limpieza, acondicionamiento y montaje

Se transportó al laboratorio las larvas colectadas en el campo contenidas en un recipiente con agua tomada del sitio de cría. Una vez allí, se las colocó en cápsulas de vidrio con agua del medio y materia orgánica y tapados con tela mosquitera para evitar el escape de los adultos al emerger. Se observó diariamente las larvas hasta completar su ciclo biológico, y se las alimentó diariamente con agua con nutrientes. Alcanzado el estado de pupa, o las pupas colectadas y criadas como tales, se las ubicó individualmente en tubos de ensayo con 5 ml de agua limpia y un tapón de algodón. Se revisó diariamente hasta la emergencia del adulto. Una vez emergido el adulto, se esperó 24 horas para asegurar la completa pigmentación de éste.

Previo a su montaje, se acondicionó las muestras según las técnicas descritas por Ronderos *et al.* (2000) y Ronderos *et al.* (2008a), las cuales preservan la morfología original de los especímenes. Se trató a las larvas con ácido glicólico 50% por 3-4 minutos, posteriormente y bajo la lupa se procedió a limpiarlas suavemente con un pincel pelo de Marta N° 1. Una vez realizada la limpieza, se lavó cada ejemplar, se los pasó por ultrasonidos y finalmente se los conservó en alcohol 70% para su posterior montaje en láminas.

Posteriormente, cada preimago se trató con fenol saturado en alcohol absoluto, aclarados con KOH y montadas entre porta y cubreobjetos con bálsamo de Canadá, según las técnicas de Borkent & Spinelli (2007). Con la misma técnica se montó en un

mismo portaobjetos a los adultos emergidos en el laboratorio y sus correspondientes exuvias, que corresponde al ciclo completo, lo cual asegura una identificación precisa. Se depositó en la colección científica del Centro de Investigaciones Entomológicas de la ciudad de Posadas todos los ejemplares colectados.

2.6- Extracción del ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó a partir del tórax y abdomen de 125 hembras individuales previamente identificadas, según el protocolo de Doyle & Doyle (1987), con modificaciones realizados por Ayala *et al.* (2011). El cual se detalla a continuación: la muestra se maceró en 160 μ l de Buffer de Extracción (Tris/HCl 100 mM, EDTA 50 mM y ClNa 0,1M), 20 μ l de SDS 2%, 40 μ l de CTAB 2% y 1 μ l de Proteinasa K. Se incubó por 1 h a 65°C, agitando con vórtex cada 10 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó 200 μ l de Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó por 5 min a 12.000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se agregó 150 μ l de Acetato de K (3M). Se centrifugó nuevamente por 5 min a 12.000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de etanol absoluto. Se centrifugó 5 min a 12.000 rpm y se descartó por "golpe seco" el sobrenadante, se agregó 800 μ l de etanol 70%, se centrifugó 5 minutos a 12.000 rpm. Se descartó nuevamente el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. Se resuspendió el ADN en 30 μ l de agua didestilada.

La cuantificación del ADN se realizó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia corresponde a 50 μ g μ L⁻¹ de ADN.

2.7- Amplificación por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se trabajó con dos marcadores moleculares para la identificación de *C. insignis*, el primer espaciador transcrito interno (ITS-1) y la subunidad I del gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa (COI).

Para la amplificación de regiones altamente conservadas que flanquean al ITS-1 se utilizó los cebadores para el género *Culicoides* PanCulF y PanCulR (ver Tabla II). La amplificación se llevó a cabo según Cêtre-Sossah *et al.* (2004) con modificaciones, en un volumen final de 20 μ l, con Buffer de la Taq polimerasa al 1X, Cloruro de Magnesio

2mM, dNTPs 0,2 mM, cebador sentido 10 pmol, cebador antisentido 10 pmol, Taq polimerasa 0,5 U. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, luego 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C y 1 min a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C.

Para la amplificación del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI barcode) se utilizó los cebadores CulCOI (ver Tabla II), se trabajó con las condiciones propuestas por Lassen *et al.* (2011), en un volumen final de 20 µl, con Buffer de la Taq polimerasa al 1X, Cloruro de Magnesio 2mM, dNTPs 0,2 mM, cebador sentido 10 pmol, cebador antisentido 10 pmol, Taq polimerasa 0,5 U. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 54°C y 30 s a 72°C cada uno, con una extensión final de 7 min a 72°C.

Tabla II. Secuencia de cebadores utilizados para la identificación de *Culicoides*

Cebadores	Secuencia de 5' a 3'	Referencia
PanCul F	GTAGGTGAACCTGCGGAAGG	Cêtre-Sossah <i>et al.</i> 2004
PanCul R	TGCGGTCTTCATCGACCCAT	Cêtre-Sossah <i>et al.</i> 2004
CulCOI F	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC	Lassen <i>et al.</i> 2011
CulCOI R	CCCGGTAAAATTTAAAATAAACTTC	Lassen <i>et al.</i> 2011

Para ambos marcadores se utilizó un volumen de 1 µl de ADN genómico en cada reacción de PCR y se incluyeron controles negativos. Mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y teñidos con Gel Red se examinó los productos de amplificación utilizando un marcador de Peso Molecular de 100 pb.

2.8- Secuenciamiento y análisis bioinformático de las secuencias ITS-1 y COI

La base de datos del GenBank no cuenta con registros de secuencias de especies de *Culicoides* presentes en la región Neotropical. Por lo tanto, para comparar y corroborar la identidad específica de las secuencias de *C. insignis* obtenidas se procedió a secuenciar 10 muestras para cada marcador.

La secuenciación de los productos de amplificación para ambos marcadores moleculares se realizó con la empresa MacroGen. Posteriormente se realizó la limpieza de las

secuencias mediante el análisis y la edición de los electroferogramas utilizando el software BioEdit Version 7.2.5 (Hall, 1999). Se comparó una a una cada base de las secuencias con la lectura de su correspondiente electroferograma, y se comprobó que ambos coincidieran.

Con las secuencias sentido y antisentido corregidas se generó una secuencia consenso para cada marcador, la cual se utilizó como *query* para verificar la coincidencia con la región amplificada y el organismo en cuestión. Se trabajó con la base de datos NR (no redundante) del NCBI usando la herramienta Blast, donde el alineamiento se realizó de acuerdo a los parámetros establecidos por *default* del programa.

2.8.1- Análisis de datos, alineamiento y diseño del cebador sentido para *C. insignis*

Se realizó un análisis detallado de las secuencias consenso obtenidas para la región ITS-1 de *C. insignis*. Se identificó regiones conservadas del género *Culicoides* y aquellas específicas de *C. insignis* mediante diversos alineamientos realizados con el programa ClustalW incluido en el software MEGA 5.10 (Tamura *et al.*, 2011) con las secuencias de *C. insignis* y otras secuencias ITS-1 de *Culicoides* extraneotropicales, considerados vectores del BTV, obtenidas de GenBank. Las secuencias ITS-1 utilizadas, número de acceso, longitud y contenido de G+C se detalla en la Tabla III.

Tabla III. Número de acceso, longitud y composición de bases de las secuencias ITS-1 de *Culicoides* utilizadas

Especies de <i>Culicoides</i>	Número de acceso	Longitud (pb)	Contenido G+C (%)
<i>C. variipennis</i> (Coquillet)	KP310092	351	31,91
<i>C. imicola</i> Kieffer	JN408479	393	34,61
<i>C. albicans</i> (Winnertz)	AJ417980	461	36,02
<i>C. obsoletus</i> (Meigen)	AY861152	397	36,52

A partir de la región específica de *C. insignis* se diseñó el cebador sentido específico para ésta especie. No se utilizaron programas online para la obtención del cebador, sino que el mismo fue diseñado a partir del análisis de la secuencia base por base.

Una vez diseñado el cebador se trabajó con el programa online Oligoanalyzer 3.0 (Integrated DNA Technologies, Inc) para evaluar la autohibridación y/o posible

formación de dímeros con el cebador antisentido y la temperatura a la cual ocurre el apareamiento entre bases.

Posteriormente se sintetizó el cebador y se realizó pruebas correspondientes para comprobar la especificidad del mismo.

2.8.2- Estandarización de las condiciones de PCR para la identificación de *C. insignis* y cálculos de especificidad

La amplificación con los cebadores Cul_insigF/ PanCulR se realizó en un volumen final de 20 µl, con Buffer de la Taq polimerasa al 1X, Cloruro de Magnesio 2mM, dNTPs 0,2 mM, cebador sentido 10 pmol, cebador antisentido 10 pmol, Taq polimerasa 0,5 U. Las condiciones de ciclado fueron: una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, luego 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C y 1 min a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C.

Posteriormente se calculó la especificidad a partir de las amplificaciones de 9 individuos de *C. insignis* (verdaderos positivos, VP) y 3 individuos de la especie *C. debilipalpis* (verdaderos negativos, VN) (Burgueño *et al.*, 1995). Con los resultados se confeccionó una tabla de contingencia considerando como falsos positivos (FP) aquellas muestras de *C. debilipalpis* que producían una amplificación, y como falsos negativos (FN) aquellas muestras de *C. insignis* que no producían amplificaciones de la región analizada.

Estas amplificaciones se realizaron en las condiciones óptimas de amplificación estandarizadas. A partir de estos datos se calculó la especificidad (E) según la ecuación que se detalla a continuación:

$$E = VN / (VN + FP)$$

2.8.3- Cálculos de distancia entre *C. insignis* y otras especies de *Culicoides*

El dendograma se infirió con el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), y la distancia se calculó mediante el método Kimura 2 Parámetros (Kimura, 1980) con el software MEGA 5.10 (Tamura *et al.*, 2011). Los valores de bootstrap por cada nodo se calcularon usando 2000 repeticiones para evaluar la solidez del método. En ambos casos se seleccionó como grupo externo a *Anopheles gambiae* (Número de acceso en el GenBank: X67157 (ITS-1) y DQ792577 (COI)).

En adición a las secuencias obtenidas para *C. insignis* se trabajó con secuencias ITS-1 y COI de especies de *Culicoides* no citadas para la Región Neotropical disponibles en GenBank (Tabla IV y V).

Tabla IV. Número de acceso de las secuencias ITS-1 de *Culicoides* en el GenBank para análisis de distancia

Especies de <i>Culicoides</i>	Número de acceso
<i>Culicoides pulicaris</i>	AJ417983
<i>Culicoides albicans</i>	AJ417980
<i>Culicoides punctatus</i>	AY861157
<i>Culicoides imicola</i>	JN408479
<i>Culicoides obsoletus</i>	AY861152
<i>Culicoides variipennis</i>	KP310091
<i>Culicoides verbosus</i>	AB462281
<i>Culicoides heteroclitus</i>	AY861143
<i>Culicoides kibunensis</i>	AY861146

Tabla V. Número de acceso de las secuencias COI de *Culicoides* en el GenBank para análisis de distancia

Especies de <i>Culicoides</i>	Número de acceso
<i>Culicoides pulicaris</i>	JQ620171
<i>Culicoides albicans</i>	JQ620029
<i>Culicoides punctatus</i>	JQ620184
<i>Culicoides imicola</i>	KT307824
<i>Culicoides kibunensis</i>	JQ620097
<i>Culicoides newsteadi</i>	AM236738
<i>Culicoides obsoletus</i>	JQ620130

Posteriormente se corroboró la validez de la secuencia COI obtenida para *C. insignis*, para ello se calculó la divergencia entre especies mediante el modelo de Kimura 2 Parámetros, y se utilizó el método de Neighbour-Joining para visualizar el agrupamiento de especies.

CAPITULO 3. RESULTADOS

3.1- Identificación morfológica de especies de *Culicoides*

Se capturaron 3590 ejemplares de *Culicoides* correspondientes a 22 especies, distribuidos en 6 subgéneros y en 5 grupos de especies. Las especies, los subgéneros y los grupos a los que pertenecen, el número de individuos colectados para cada especie (ni) y la abundancia relativa de la especie (pi), se detallan en la siguiente tabla VI:

Tabla VI. Especies y Subgénero de *Culicoides* colectadas en la provincia de Misiones.

Especie	Subgénero/ grupo de especies	Ni	Pi
<i>C. pusillus</i> Lutz	Avaritia Fox	9	0,0025
<i>C. bambusicola</i> Lutz	Cotocripus <i>Bretes</i>	6	0,0017
<i>C. chacoensis</i> Spinelli & Wirth	Drymodesmyia Vargas	1	0,0003
<i>C. debilipalpis</i> Lutz	Haematomyidium Goeldi	48	0,0134
<i>C. dureti</i> Ronderos & Spinelli	Haematomyidium Goeldi	2	0,0006
<i>C. flinti</i> Wirth	Haematomyidium Goeldi	15	0,0042
<i>C. ginesi</i> Ortiz	Haematomyidium Goeldi	3	0,0008
<i>C. lahillei</i> (Iches)	Haematomyidium Goeldi	41	0,0114
<i>C. paraensis</i> (Goeldi)	Haematomyidium Goeldi	66	0,0184
<i>C. charruus</i> Spinelli & Martinez	Hoffmania Fox	1	0,0003
<i>C. fernandoi</i> Tavares & Souza	Hoffmania Fox	15	0,0042
<i>C. foxi</i> Ortíz	Hoffmania Fox	1	0,0003
<i>C. guttatus</i> (Coquillett)	Hoffmania Fox	4	0,0011
<i>C. insignis</i> Lutz	Hoffmania Fox	3007	0,8376
<i>C. plaumanni</i> Spinelli	Hoffmania Fox	12	0,0033
<i>C. venezuelensis</i> Ortíz & Mirsa	Psychophaena Philippi	96	0,0267
<i>C. guarani</i> Ronderos & Spinelli	Grupo <i>eublepharus</i>	15	0,0042
<i>C. leopoldoi</i> Ortiz	Grupo <i>fluvialis</i>	25	0,0070
<i>C. gabaldoni</i> Ortíz	Grupo <i>leoni</i>	3	0,0008
<i>C. limai</i> Barreto	Grupo <i>limai</i>	189	0,0526
<i>C. willinki</i> Spinelli & Veggiani Aybar	Grupo <i>limai</i>	30	0,0084
<i>C. pifanoi</i> Ortíz	Grupo <i>reticulatus</i>	1	0,0003

Número total de individuos (n) 3590

De los 12 Departamentos de la provincia de Misiones en los cuales se realizaron muestreos, 7 de ellos fueron positivos para la captura de ejemplares de *Culicoides* (Figura 9).

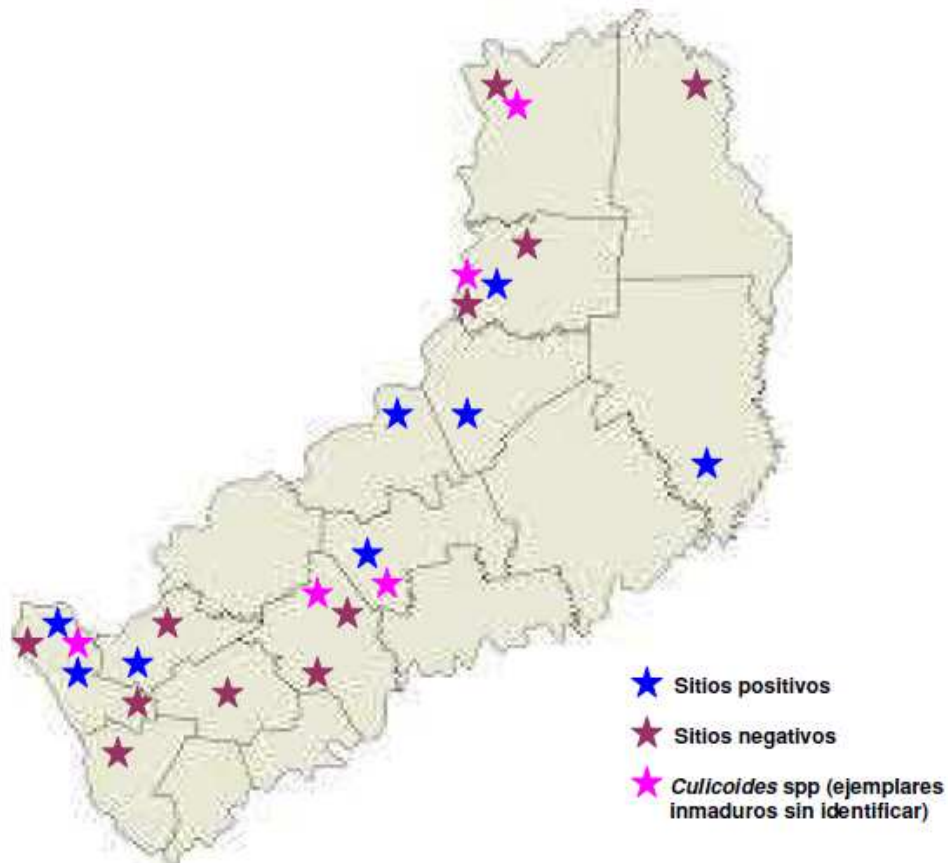


Figura 9. Sitios de muestreo de *Culicoides* en la provincia de Misiones

Los sitios de muestreos positivos, el tipo de ambiente y métodos de captura se detallan en la Tabla VII. Asimismo, los sitios donde se realizaron muestreos con resultado negativo se detallan en la Tabla VIII.

Tabla VII. Lugares y fechas de muestreo donde se recolectaron ejemplares de *Culicoides* en la provincia de Misiones.

Departamento- Municipio	Lugar de muestreo/ Fecha	Tipo de ambiente	Métodos de captura			
			Adultos		Inmaduros	
			Trampa de luz	Otros	Pipetas plásticas	Bandejas plásticas
Eldorado- Eldorado	Domicilio particular (11/2016)	Urbano	X	-	-	-
San Pedro- San Pedro	Parque provincial Esmeralda- Reserva Biosfera Yabotí (02/2016)	Silvestre	X	-	-	-
Montecarlo- Montecarlo	Domicilio particular Museo Loma Alta (09/2016)	Silvestre	X	-	-	-
Libertador Gral San Martín- El Alcázar Cainguás- Campo Grande	Camping Paranay (09/2014)	Selvático	X	Colecta directa (manual)	-	-
	Domicilio particular (2015)	Rural	X	-	-	X (potrero de vacas)
	A ^a Profundidad. Parque Provincial Cañadón de Profundidad (09/2016)	Selvático	-	-	-	X (margen del arroyo)
Capital- Garupá	Domicilio particular (10/2014)	Urbano	X	-	-	-
Capital- Garupá	Estancia “Santa Inés” (10/2014) (11/2014)	Rural- Silvestre	-	-	X (fitotel- mata)	-
Capital- Posadas	Domicilio particular (01/2015) (10/2015)	Urbano	X	-	X (hueco de árbol)	-
Capital- Posadas	Reserva: Area de Recursos Ambientales El Zaimán. (05/2014) (06/2014)	Humedal periurbano	X	-	X (fitotel- mata)	-
Capital- Posadas	Campus Universitario UNAM (2013)	Periurbano	X	-	-	-

Los sitios negativos corresponden a los puntos donde se instalaron las trampas de luz sin colectarse ejemplares adultos de *Culicoides*, y aquellos lugares donde se colectaron estados inmaduros que no completaron su ciclo de vida en el laboratorio, y por lo tanto no pudieron ser identificados taxonómicamente a nivel específico. No se colectaron larvas de los primeros estadios larvales.

Tabla VIII. Lugares y fechas de muestreo con resultados negativos para *Culicoides* en la provincia de Misiones.

Departamento- Municipio	Lugar de muestreo/ Fecha	Tipo de ambiente	Métodos de captura			
			Adultos		Inmaduros	
			Trampa de luz	Otros	Pipetas plásticas	Bandejas plásticas
General Manuel Belgrano. Comandante Andresito	Domicilio particular (09/2015)	Urbano	X	-	-	-
Iguazú- Puerto Iguazú	Domicilio particular. B° 2000 ha (08/2016)	Zona de desmonte	X	-	-	X (laguna y charcos)
Eldorado- Eldorado	Arroyo Pomar (09/2016)	Silvestre	-	-	-	X (margen del arroyo)
Eldorado- Eldorado	Arroyo Paticuá (10/2016)	Silvestre	-	-	-	X (margen del arroyo)
Eldorado- Eldorado	Salto Küppers. (09/2015)	Selvático	X	-	X (fitotelmata)	-
Eldorado- Colonia Victoria	Puerto Victoria (11/2016)	Periurbano	-	-	X (fitotelmata)	X (margen del río)
Eldorado- Colonia Delicia	Arroyo Aguaray Miní (10/2016)	Silvestre	-	-	-	X (margen del arroyo)
Oberá- Oberá	Salto Krysiuk (08/2015)	Selvático	-	-	X (fitotelmata)	-
Oberá- Campo Viera	Arroyo Macuco. Colonia Yermal Viejo (07/2015)	Silvestre	-	-	-	X (margen del arroyo)
Oberá- Campo Ramón	Arroyo Ramón. Colonia Yermal Viejo (07/2015)	Silvestre	-	-	-	X (margen del arroyo)
Leandro N. Alem- L. N. Alem	Domicilio particular (05/2014)	Urbano	X	-	-	-

Continuación Tabla VIII.

Departamento- Municipio	Lugar de muestreo	Tipo de ambiente	Método de colecta			
			Adultos		Inmaduros	
			Trampa de luz	Otros	Pipetas plásticas	Bandejas plásticas
Apóstoles- San José	Domicilio particular (03/2014)	Rural	X	-	-	X (laguna)
Candelaria- Candelaria	Club UPCN (10/2014)	Periurbano silvestre	-	-	-	X (margen de pileta y laguna)
Candelaria- Santa Ana	Domicilio particular (12/2014)	Rural	-	-	-	X (laguna)
Capital- Fachinal	Arroyo Zanabria (03/2014)	Silvestre	-	-	-	X (margen del arroyo)
Capital- Fachinal	Domicilio particular (05/2014)	Rural	X	-	-	-
Capital- Fachinal	Arroyo Liso (02/2014)	Silvestre	-	-	-	X (margen del arroyo)
Posadas	Arroyo Zaimán (07/2014) (08/2014)	Urbano	-	-	-	X (margen del arroyo)
Posadas	Arroyo Itá (09/2014) (10/2014)	Urbano	-	-	-	X (margen del arroyo)
Posadas	Arroyo Antonica (09/2014) (10/2014)	Urbano	-	-	-	X (margen del arroyo)

Se capturaron representantes de 22 de las 30 especies de *Culicoides* citadas hasta el momento para la provincia de Misiones. A su vez, *C. chacoensis* Spinelli & Wirth, *Culicoides plaumanni* Spinelli, *C. willinki* Spinelli & Veggiani Aybar y *C. pifanoi* Ortíz son citadas por primera vez para esta provincia. La cita de la última especie mencionada resulta, además, el primer registro para la Argentina.

Del total de *Culicoides* colectados para este trabajo, 3539 fueron adultos capturados con trampa de luz, y 51 fueron los ejemplares que emergieron de los estados inmaduros (larvas y pupas) criados en laboratorio. El porcentaje de hembras corresponde al 67,1% (n=2408), mientras que los machos colectados representan un 32,9% (n=1182) del total. Las especies colectadas, sus sitios y el tipo de trampa utilizada, el número de hembras y machos recolectados son detallados en la Tabla IX.

Tabla IX. Especies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) colectadas en la provincia de Misiones.

(H: hembra, M: macho, T: n total, TL: colecta realizada con trampa de luz tipo CDC, CD: colecta directa, E: ejemplar emergido)

Especies	Lugar de colecta		Número de ejemplares colectados			Tipo de trampa
	Departamento	Municipio	H	M	T	
<i>Culicoides pusillus</i> Lutz	Capital	Posadas	2	-	2	TL
	Cainguás	Campo Grande	5	2	7	TL
<i>Culicoides bambusicola</i> Lutz	Capital	Posadas	1	1	2	TL
			3	-	3	E
<i>Culicoides chacoensis</i> Spinelli & Wirth	Montecarlo	Montecarlo	-	1	1	TL
	Cainguás	Campo Grande	1	-	1	TL
<i>Culicoides debilipalpis</i> Lutz	Capital	Posadas	18	11	29	TL
			6	3	9	E
			2	-	2	E
		Garupá	5	3	8	E
<i>Culicoides dureti</i> Ronderos & Spinelli	Cainguás	Campo Grande	2	-	2	TL
<i>Culicoides flinti</i> Wirth	Capital	Posadas	15	-	15	TL
<i>Culicoides ginesi</i> Ortíz	San Pedro	San Pedro	3	-	3	TL
<i>Culicoides lahillei</i> (Iches)	San Pedro	San Pedro	6	-	6	TL
	Libertador Gral					
	San Martín	El Alcázar	12	8	20	TL
<i>Culicoides paraensis</i> (Goeldi)			15	-	15	CD
	Montecarlo	Montecarlo	2	-	2	TL
	San Pedro	San Pedro	1	-	1	TL
	Cainguás	Campo Grande	43	7	50	TL
	Capital	Garupá	7	6	13	E
<i>Culicoides charruus</i> Spinelli & Martinez	Cainguás	Campo Grande	1	-	1	TL
<i>Culicoides fernandoi</i> Tavares & Souza	Capital	Posadas	11	4	15	TL
<i>Culicoides foxi</i> Ortíz	Cainguás	Campo Grande	1	-	1	TL

Continuación Tabla IX.

Especies	Lugar de colecta		Número de ejemplares colectados			Tipo de colecta
	Departamento	Municipio	H	M	T	
<i>Culicoides insignis</i> Lutz	Capital	Posadas	1954	998	2952	TL
		Garupá	-	2	2	TL
	Candelaria Cainguás	Profundidad	1	-	1	E
		Campo Grande	47	4	51	TL
<i>Culicoides guttatus</i> (Coquillett)	Capital Cainguás	Posadas	3	-	3	TL
		Campo Grande	1	-	1	TL
<i>Culicoides plaumanni</i> Spinelli	Capital Cainguás	Posadas	9	1	10	TL
		Campo Grande	2	-	2	TL
<i>Culicoides venezuelensis</i> Ortíz & Mirsa	Capital	Posadas	76	10	86	TL
		Garupá	-	1	1	TL
	Cainguás	Campo Grande	4	-	4	TL
	Eldorado	Eldorado	5	-	5	TL
<i>Culicoides guarani</i> Ronderos & Spinelli	Capital Cainguás	Garupá	9	6	15	E
		Campo Grande	1	-	1	TL
<i>Culicoides leopoldoi</i> Ortiz	Capital	Posadas	13	-	13	TL
		Cainguás				
	Cainguás	Campo Grande	9	3	12	TL
<i>Culicoides limai</i> Barretto	Capital	Posadas	30	5	35	TL
		Cainguás				
	Cainguás	Campo Grande	74	80	154	TL
<i>Culicoides willinki</i> Spinelli & Veggiani Aybar	Cainguás	Campo Grande	5	25	30	TL
<i>Culicoides pifanoi</i> Ortíz	Cainguás	Campo Grande	1	-	1	TL
<i>Culicoides gabaldoni</i> Ortíz	Montecarlo	Montecarlo	2	1	3	TL

Ciertas especies de *Culicoides* fueron recolectadas únicamente en determinados sitios de la provincia. En efecto, en estado adulto y mediante trampas de luz, *C. chacoensis*, *C. dureti*, *C. charruus*, *C. guarani*, *C. foxi*, *C. willinki* y *C. pifanoi* fueron colectadas sólo en el Municipio de Campo Grande, Departamento Cainguás, mientras que *C. flinti* y *C. fernandoi* estuvieron presentes sólo en la Ciudad de Posadas, Departamento Capital. Por otro lado, *C. gabaldoni* y *C. ginesi* fueron colectados en los Departamentos Montecarlo y San Pedro, respectivamente.

Culicoides pifanoi, *C. foxi*, *C. charruus*, *C. guarani* y *C. chacoensis* estuvieron representadas por un único ejemplar colectado en Campo Grande, pese a que se realizaron muestreos mensuales en el período de un año.

Culicoides dureti, *C. gabaldoni* y *C. ginesi* también fueron colectados en bajo porcentaje, mientras que *C. bambusicola*, *C. guttatus*, *C. plaumanni*, *C. venezuelensis*, *C. leopoldoi*, *C. debilipalpis*, *C. lahillei*, *C. insignis*, *C. paraensis*, *C. pusillus* y *C. limai* estuvieron representados en número variable en diferentes sitios de muestreo a lo largo de la provincia.

Culicoides lahillei fue colectado en el Parque Provincial Esmeralda, dentro de la Reserva Biosfera Yabotí; y en el Camping Paraná del Municipio de El Alcázar, ubicados en el Departamento San Pedro y Departamento Libertador General San Martín, respectivamente. La colecta de los especímenes se realizó no sólo con la trampa de luz sino también por captura directa manual (n=15) a través de cebo humano.

Culicoides paraensis fue muy abundante en el Municipio de Campo Grande, mientras que *C. debilipalpis* fue colectada en diversos sitios del Departamento Capital, incluyendo la ciudad de Posadas. Sus estados inmaduros fueron encontrados en fitotelmata y en hojarasca húmeda.

3.1.1- Especies de *Culicoides* recolectadas en la ciudad de Posadas

Se capturaron 3162 ejemplares adultos de *Culicoides* durante el período comprendido entre enero y diciembre de 2013. La trampa de luz fue instalada en el Centro de Investigaciones Entomológicas - PTMi, dicha institución se encuentra adyacente al predio de una reserva urbana ubicada en cercanías al Campus Universitario de esta ciudad, esta zona se corresponde a un ambiente antropizado con abundante vegetación circundante.

El porcentaje de cada una de las especies recolectadas fue el siguiente: *C. insignis* (93,4%), *C. venezuelensis* (2,72%), *C. limai* (1,11%), *C. debilipalpis* (0,92%), *C. flinti* (0,47%), *C. fernandoi* (0,47%), *C. leopoldoi* (0,41%), *C. plaumanni* (0,32%), *C. guttatus* (0,094%), *C. bambusicola* (0,063%) y *C. pusillus* (0,063%) (Tabla X).

Tabla X. Especies de *Culicoides* recolectadas en la Ciudad de Posadas, Misiones, entre enero y diciembre de 2013

(*ni* = número de individuos de la especie *i*; *pi* = abundancia proporcional de la especie *i*)

Especies	Ni	pi	% del total
<i>C. insignis</i> Lutz	2952	0,933	93,36 %
<i>C. venezuelensis</i> Ortíz & Mirsa	86	0,027	2,72 %
<i>C. limai</i> Barretto	35	0,011	1,11 %
<i>C. debilipalpis</i> Lutz	29	0,009	0,92 %
<i>C. flinti</i> Wirth	15	0,004	0,47%
<i>C. fernandoi</i> Tavares & Souza	15	0,004	0,47 %
<i>C. leopoldoi</i> Ortiz	13	0,004	0,41 %
<i>C. plaumanni</i> Spinelli	10	0,003	0,32 %
<i>C. guttatus</i> (Coquillett)	3	0,0009	0,094 %
<i>C. bambusicola</i> Lutz	2	0,0006	0,063 %
<i>C. pusillus</i> Lutz	2	0,0006	0,063 %
N° total de individuos (n)	3162	-	100 %

Culicoides insignis estuvo representada durante todos los meses del año, con picos de abundancia en junio (n=638) y julio (n=992), (Figura 10).

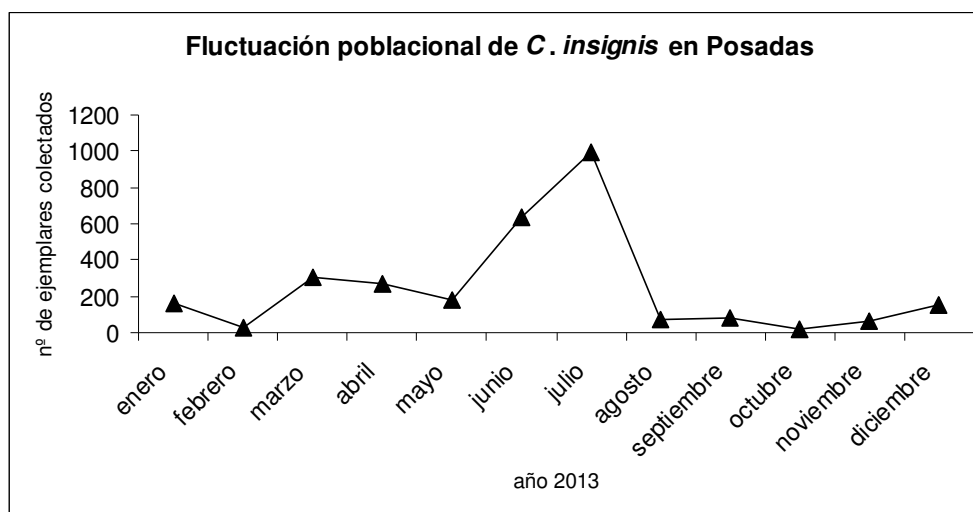


Figura 10. Fluctuación poblacional de *Culicoides insignis* en la Ciudad de Posadas, Misiones, entre enero y diciembre de 2013

Se observaron también picos de abundancia de *C. venezuelensis* en julio (n=25) y septiembre (n=30), mientras que *C. limai* y *C. debilipalpis* presentaron un mayor número de ejemplares en octubre (n=25 y n=12 respectivamente) (Figura 11). Las restantes especies, con sólo 60 ejemplares capturadas, representan solamente un 1,89 % del total.

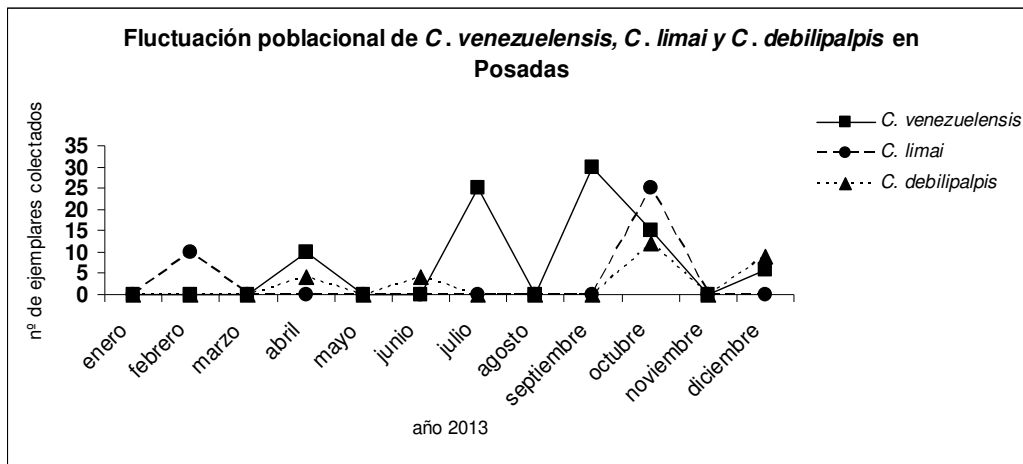


Figura 11. Fluctuación poblacional de *C. venezuelensis*, *C. limai* y *C. debilipalpis* en la Ciudad de Posadas, Misiones, entre enero y diciembre de 2013

3.1.2- Efecto de las variables climáticas en la abundancia de *C. insignis* en la ciudad de Posadas

La relación entre el número de *C. insignis* capturados y las variables climáticas fue analizada por regresión lineal multivariada. La humedad relativa media mensual presentó un valor estadísticamente significativo con un valor p menor a 0,05 en un intervalo de confianza del 95%. Estos resultados indican que la única variable climática que tuvo influencia en la abundancia de *C. insignis* en la ciudad de Posadas durante el período comprendido entre enero y diciembre de 2013 fue la humedad relativa media mensual ($y: -1769,03 + 28,61 x_5; R^2 \text{ ajustado} = 0,32; P < 0,0336$) (Figura 12). Ninguna de las otras variables correlacionó significativamente con la abundancia de *C. insignis* a lo largo del período de muestreo considerado.

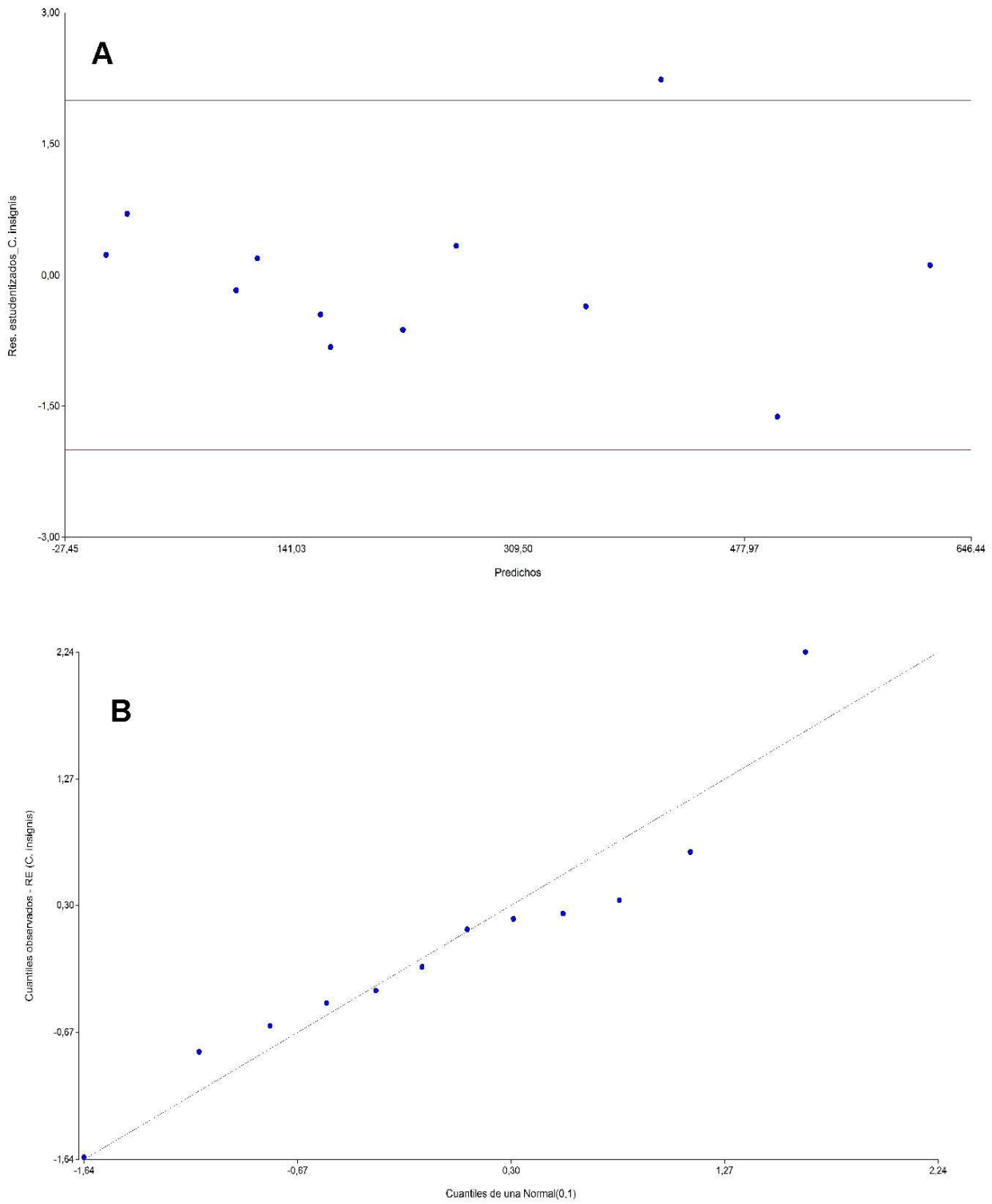


Figura 12. Análisis de regresión lineal multivariada entre la humedad relativa media mensual y el número de especímenes de *C. insignis* colectados en la ciudad de Posadas durante el período comprendido entre enero y diciembre de 2013. Validación de los modelos de regresión en: A. Residuos vs Valores predichos y B. Q-Q normal.

3.1.3- Especies de *Culicoides* recolectadas en Campo Grande

Se capturaron 318 ejemplares adultos de *Culicoides* durante el período comprendido entre enero y diciembre de 2015. El área de trabajo se corresponde a un ambiente rural, con un importante número de ganado y animales de granja; la trampa de luz fue instalada en el sitio donde duermen las vacas.

El porcentaje de cada una de las especies recolectadas fue: *C. limai* (48,6%), *C. insignis* (16,1%), *C. paraensis* (15,8%), *C. willinki* (9,46%), *C. leopoldoi* (3,79%), *C. pusillus* (2,21%), *C. venezuelensis* (1,26%), *C. dureti* (0,63%), *C. plaumanni* (0,63%), *C. guttatus* (0,31%), *C. pifanoi* (0,31%), *C. charruus* (0,31%), *C. chacoensis* (0,31%) y *C. foxi* (0,31%) (Tabla XI).

Tabla XI. Especies de *Culicoides* recolectadas en el Municipio de Campo Grande, Misiones, entre enero y diciembre de 2015

(*ni* = número de individuos de la especie *i*; *pi* = abundancia proporcional de la especie *i*)

Especies	Ni	pi	% del total
<i>C. limai</i> Barretto	154	0,484	48,43 %
<i>C. insignis</i> Lutz	51	0,160	16,04 %
<i>C. paraensis</i> (Goeldi)	50	0,157	15,71 %
<i>C. willinki</i> Spinelli & Veggiani Aybar	30	0,094	9,43 %
<i>C. leopoldoi</i> Ortiz	12	0,038	3,77 %
<i>C. pusillus</i> Lutz	7	0,022	2,2 %
<i>C. venezuelensis</i> Ortiz & Mirsa	4	0,013	1,3 %
<i>C. dureti</i> Ronderos & Spinelli	2	0,006	0,63 %
<i>C. plaumanni</i> Spinelli	2	0,006	0,63 %
<i>C. guttatus</i> (Coquillett)	1	0,003	0,31 %
<i>C. pifanoi</i> Ortiz	1	0,003	0,31 %
<i>C. charruus</i> Spinelli & Martínez	1	0,003	0,31 %
<i>C. chacoensis</i> Spinelli & Wirth	1	0,003	0,31 %
<i>C. foxi</i> Ortíz	1	0,003	0,31 %
<i>C. guarani</i> Ronderos & Spinelli	1	0,003	0,31 %
N° total de individuos (n)	318	-	100 %

La especie mejor representada fue *C. limai* con 154 ejemplares recolectados. El número de individuos de esta especie presentó una gran variación a lo largo del año, y estuvo presente en la mayoría de los meses del año, excepto en diciembre, presentando picos de abundancia en febrero (n=39) y mayo (n=33) (Figura 13).

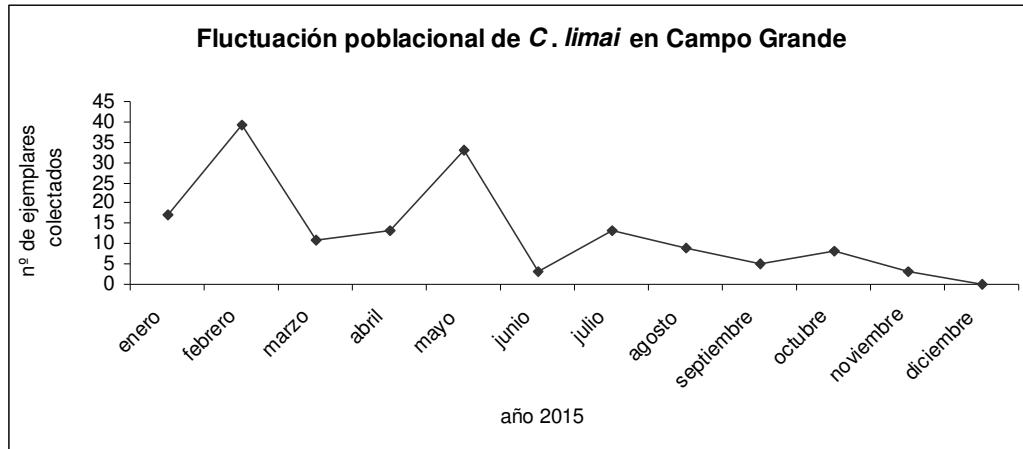


Figura 13. Fluctuación poblacional de *Culicoides limai* en el Municipio de Campo Grande, Misiones, entre enero y diciembre de 2015

Además fueron abundantes *C. insignis* y *C. paraensis* con un total de 51 y 50 ejemplares respectivamente a lo largo de todo el período de muestreo presentando dos picos de abundancia como se observa en la Figura 14.

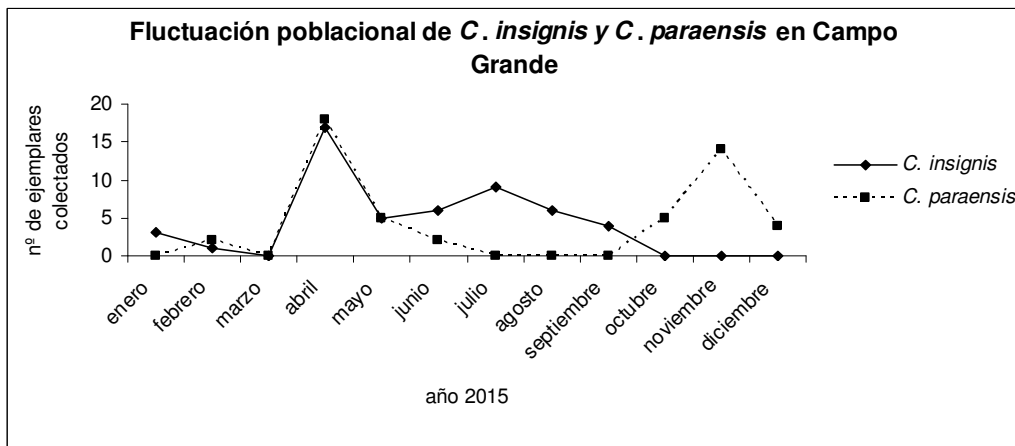


Figura 14. Fluctuación poblacional de *C. insignis* y *C. paraensis* en el Municipio de Campo Grande, Misiones, entre enero y diciembre de 2015

3.1.4- Estados inmaduros

Se obtuvieron 52 adultos emergidos a partir de 87 estados inmaduros capturados (42 larvas y 45 pupas) de *Culicoides*, lo que representa un 60% de eficacia en la cría en el laboratorio. En la tabla XII se muestra en forma detallada las especies recolectadas, lugar, número y tipo de criaderos, como así también los parámetros fisicoquímicos medidos en los criaderos positivos.

Tabla XII. Especies, lugar, fecha, número, tipo de criadero y parámetros fisicoquímicos donde fueron recolectados los estadios inmaduros de *Culicoides*

(n: número de ejemplares recolectados, EC: estado del ejemplar colectado, E: ejemplares emergidos, L: larva, P: pupa, T: temperatura, O₂ dis: Oxígeno disuelto, Cond: conductividad)

Especie	Lugar y fecha de colecta		N		Factores físico-químicos			
	Departamento/ Municipio- Fecha	Tipo de criadero	EC	E	T (° C)	O ₂ dis (ppm- %)	Cond (uS)	pH
<i>Culicoides debilipalpis</i>	Capital- Posadas (01/2015)	Hueco de árbol	12 (5 L, 7 P)	9	21,2	4,6 64	93,9	6,32
<i>Culicoides debilipalpis</i>	Capital- Posadas (10/2015)	Hueco de árbol	7 L	2	23,5	5,9 74	34,4	6,51
<i>Culicoides debilipalpis</i>	Capital- Garupá (10/2014)	Hojarasca húmeda	13 (4 L, 9 P)	8	20,3	4 37,2	28,2	6,25
<i>Culicoides paraensis</i>	Capital- Garupá (10/2014)	Hojarasca y tierra húmeda	19 (4 L ,15 P)	13	21	4,3 59	37,5	6,4
<i>Culicoides guarani</i>	Capital- Garupá (11/2014)	Hueco de árbol	20 (7 L ,13P)	15	22	5,18 66,8	102,4	6,84
<i>Culicoides insignis</i>	Candelaria- Profundidad (09/2016)	Arroyo	1 P	1	24,4	8,14 111,3	109,3	7,68
<i>Culicoides bambusicola</i>	Capital- Posadas (05/2014)	Internados de tacuara	5 L	3	17,3	3,82 46,4	-	7,46
<i>Culicoides</i> sp.	Capital- Posadas (06/2014)	Bromelia	1 L	1	22,3	4,26 60,9	25,9	7,1

Continuación Tabla XII.

Especie	Lugar de colecta		N		Factores físico-químicos			
	Departamento- Municipio	Tipo de criadero	EC	E	T (° C)	O ₂ dis (ppm- %)	Cond (uS)	pH
<i>Culicoides</i> sp.	Oberá- Campo Viera (07/2015)	Arroyo	1 L	-	22	-	98,3	6,87
<i>Culicoides</i> spp.	Caingúas- Campo Grande (05/2015)	Barro y heces de vaca	3 L	-	-	-	-	-
<i>Culicoides</i> spp.	Iguazú- Puerto Iguazú (08/2016)	Arroyo	3 L	-	19	-	73,6	6,15
<i>Culicoides</i> spp.	Eldorado- Eldorado (11/2016)	Hueco de árbol	2 L	-	19	-	49,2	6,43

Se identificaron los criaderos de las siguientes especies: *C. debilipalpis*, *C. paraensis*, *C. guarani*, *C. insignis* y *C. bambusicola*.

A pesar que algunas de las especies de *Culicoides* presentes en la región poseen sus estados inmaduros descriptos, la identificación taxonómica solo puede realizarse una vez emergido el adulto. Es por ello que 6 de las 9 larvas recolectadas que no completaron su ciclo de vida son consideradas como *Culicoides* spp.; mientras que las 3 larvas halladas a partir de barro y heces de ganado en el municipio de Campo Grande, sospechadas de ser posibles representantes de la especie *C. insignis* fueron conservadas para los análisis moleculares posteriores.

El tiempo de desarrollo para los especímenes criados en el laboratorio no superó las 3 semanas. *Culicoides guarani* y *C. paraensis* completaron su ciclo biológico en 9 y 15 días respectivamente, mientras que algunas larvas de *C. debilipalpis* alcanzaron el estado adulto recién a los 20 días. *Culicoides bambusicola* fue colectado en el 4° estadio larval y completó su ciclo en 5 días. El estado pupal no superó los 4 días en ninguna de las especies analizadas.

En la Figura 15 se ilustran algunos de los sitios positivos para estados inmaduros de *Culicoides*.



Figura 15. Criaderos positivos para *Culicoides* spp. A y C- Tierra húmeda; B- Hojarasca; D- Bromelia; E y H- Hueco de árbol; F- Barro y/o heces de ganado; G- Arroyo.

Los criaderos positivos fueron separados en 3 grupos para realizar el análisis y caracterización de los mismos. El primer grupo comprende los sitios de cría asociados a fitotelmata (Figura 15 D, E y H), como ser huecos de árboles, epífitas, bromelias e internados de tacuara. Se colectaron 47 ejemplares de las siguientes especies de *C. debilipalpis* (n=19), *C. guarani* (n=20) y *C. bambusicola* (n=5). En este tipo de criadero la temperatura media fue de 20,8° C, el oxígeno disuelto presentó un valor medio de 4,72 ppm y 62,42%, mientras que la conductividad eléctrica y el pH tuvieron valores medios de 61,16 uS y 6,8, respectivamente.

El segundo grupo comprende los sitios de cría compuestos por materia orgánica, hojarasca, barro y heces depositados sobre el suelo (Figura 15 A, B, C y F). Aquí se colectaron 35 ejemplares, 13 representantes de *C. debilipalpis*, 19 de *C. paraensis* y 3 larvas sospechadas de ser *C. insignis*. En este tipo de criadero se midió la profundidad a la cual se tomaron las muestras, los ejemplares de *C. paraensis* y *C. debilipalpis* fueron colectados a una profundidad no mayor a 2,5 cm; mientras que las larvas colectadas en heces de vaca (sospechadas de ser *C. insignis*) fueron recogidas a una profundidad cercana a los 3,5 a 5 cm. Se midieron los parámetros fisicoquímicos solamente la hojarasca húmeda y los valores medios fueron los siguientes: 20,65° C para la temperatura, 4,12 ppm y 96,2% para el oxígeno, 32,85 uS para la conductividad eléctrica y 6,3 para el pH.

Por último, se agrupó los sitios de cría asociados a grandes cuerpos de agua como ser arroyos (Figura 15 G). Este tipo de criadero se caracteriza por la presencia de vegetación arraigada, principalmente gramíneas, y fauna asociada representada por anfibios, peces y artrópodos, entre ellos distintos órdenes de insectos (dípteros, ditíscidos, hemípteros, odonatos, fásmidos y tricópteros), arácnidos y pequeños crustáceos. Los especímenes fueron colectados en la zona litoral, donde se encontraban preservados de las corrientes de agua que desprenden la vegetación y arrastran la fauna local. Se colectaron 5 ejemplares de *Culicoides*, de los cuales solamente uno completó su ciclo de vida y pudo ser identificado como *C. insignis*. La temperatura media registrada fue de 21,8° C, la conductividad y el Ph promedio fue de 93,7 uS y 6,9, respectivamente.

3.2- Caracterización molecular de *C. insignis*

3.2.1- Extracción del ADN y amplificación de las regiones ITS-1 y COI

Se realizó la extracción de ADN según el protocolo estandarizado por Ayala *et al.* (2011) a partir de fragmentos de tórax y segmentos anteriores del abdomen de hembras individuales del género *Culicoides* previamente identificadas. La Figura 16 se corresponde a un gel de agarosa al 1% teñido con una solución de GelRed donde puede observarse el ADN genómico total extraído a partir de ejemplares individuales de *C. insignis*.

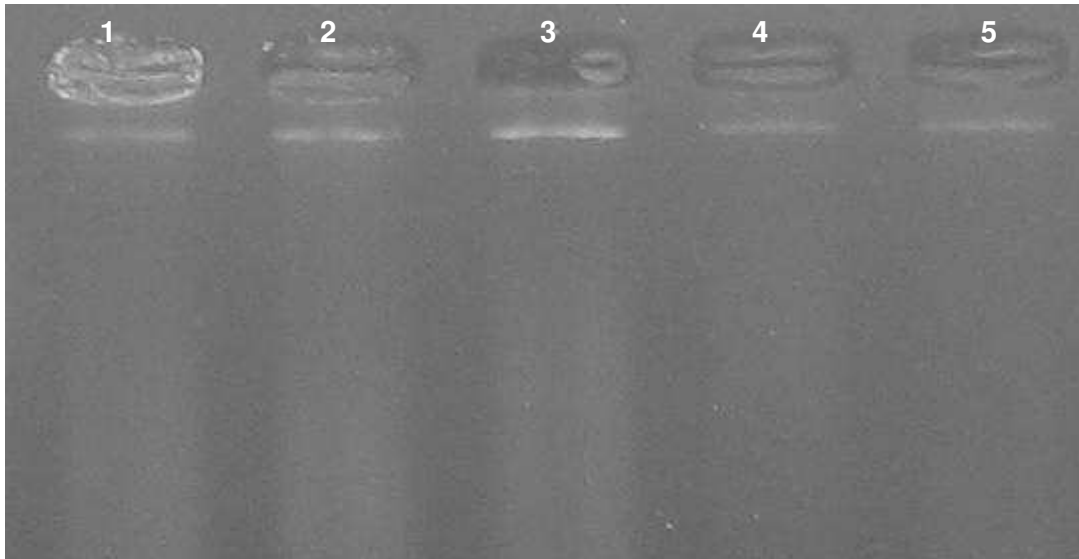


Figura 16. ADN genómico total extraído de *Culicoides insignis*

Asimismo, se realizó la extracción de ADN a partir de 7 larvas individuales de *C. debilipalpis* y 3 *C. spp.*, siguiendo el protocolo estandarizado por Ayala *et al.* (2018). Este último es una versión modificada del protocolo de extracción de ADN utilizado para ejemplares adultos, en donde la ruptura celular se realizó con el agregado al Buffer de Lisis de sacarosa 1M, mientras que la purificación del ADN y remoción de proteínas se llevó a cabo por precipitación salina, con dos lavados de acetato de potasio (con posterior incubación en hielo por 30 m) y de sodio 4 M, respectivamente.

El ADN extraído fue utilizado para amplificar mediante la técnica de PCR las regiones altamente conservadas que flanquean el primer espaciador transcrito interno (ITS-1), y

la subunidad I del gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa (COI), a partir de sus respectivos cebadores.

La cuantificación del ADN mediante espectrofotómetro indicó que cada reacción de PCR realizada contenía un promedio de 5,5 y 4,1 nanogramos de ADN sin diluir para los estados adulto y de larva, respectivamente. Los valores registrados al espectrofotómetro para cada una de las muestras utilizadas se detallan en la Tabla XIII.

Tabla XIII. Cuantificación de ADN por medición de la absorbancia a 260 nm en muestras de *Culicoides*

Espece	Estado	ADN genómico	Concentración ADN en ng
<i>C. lahillei</i>	adulto	puro (sin diluir)	6,2
<i>C. debilipalpis</i>	larva	puro (sin diluir)	4,5
<i>C. debilipalpis</i>	adulto	puro (sin diluir)	8,1
<i>C. insignis</i>	adulto	puro (sin diluir)	7,3
<i>C. insignis</i>	adulto	dilución 1/10	6,1
<i>C. insignis</i>	adulto	dilución 1/25	3,7
<i>C. sp (C. insignis ¿?)</i>	larva	puro (sin diluir)	4,1
<i>C. sp (C. insignis ¿?)</i>	larva	dilución 1/10	3,3

La electroforesis en gel de agarosa al 2% (Figura 17) teñido con solución de GelRed muestra que los productos de PCR amplificados con cebadores género-específicos para las regiones ITS1 en *C. lahillei*, *C. debilipalpis* y *C. insignis* presentan un tamaño que oscila entre los 400 a 600 pb, cuando se los compara contra un marcador de peso molecular Trans 100 pb Plus DNA Ladder de Genbiotech. Esto es acorde a los resultados esperados según la bibliografía consultada (Cêtre-Sossah *et al.* 2004).

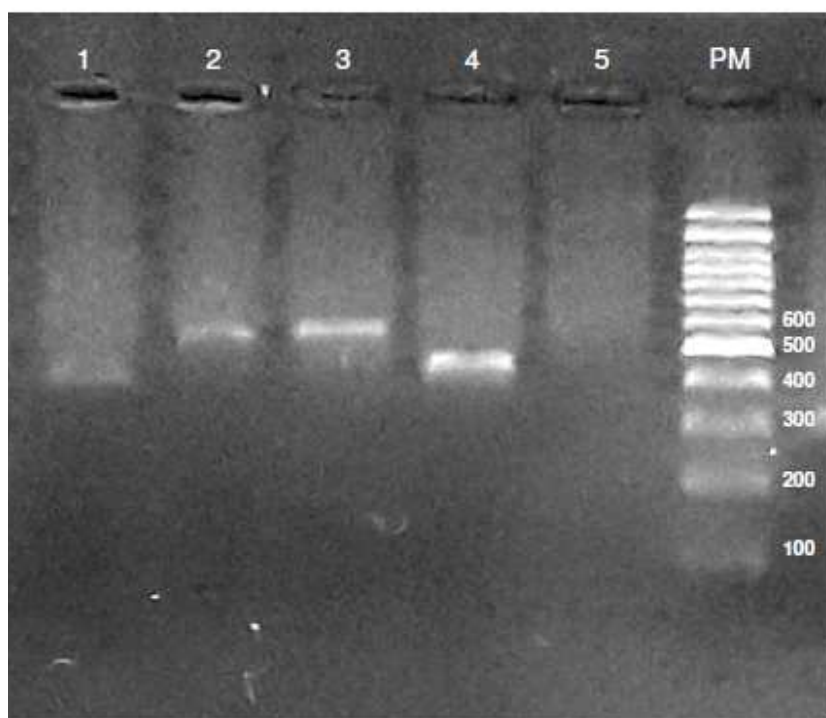


Figura 17. Productos de amplificación de la región ITS-1 en *Culicoides* por PCR (PanCulF/PanCulR)

Carriles 1 al 5: 1- *C. lahillei* (adulto, Concentración ADN: 6,2 ng), 2- *C. debilipalpis* (larva, Concentración ADN: 4,5 ng), 3- *C. debilipalpis* (adulto, Concentración ADN: 8,1 ng), 4- *C. insignis* (adulto, Concentración ADN: 7,3 ng), 5- Control negativo y PM de 100 pb.

La amplificación de regiones ITS-1 de *C. insignis* para el estado adulto da como resultado productos de amplificación de 420 pb aproximadamente. Se trabajó con muestras cuya concentración de ADN fue de 7,3 ng (ADN genómico puro), 6,1 ng (diluciones 1/10) y 3,7 ng (diluciones 1/25), los mejores resultados se obtuvieron al trabajar con ADN genómico puro (ver carril 2 al 7 en Figura 18).

De igual manera se realizaron reacciones de PCR con los cebadores género- específicos a partir del ADN extraído de larvas individuales de *Culicoides* spp. (sospechadas de ser *C. insignis*) y coincidentemente los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos para el estado adulto de *C. insignis*. El gel de agarosa al 2 % mostró productos de 420 pb. Se trabajó con muestras de ADN sin diluir, cuya concentración de ADN de 4,1 ng. (ver carril 1 en Figura 18).

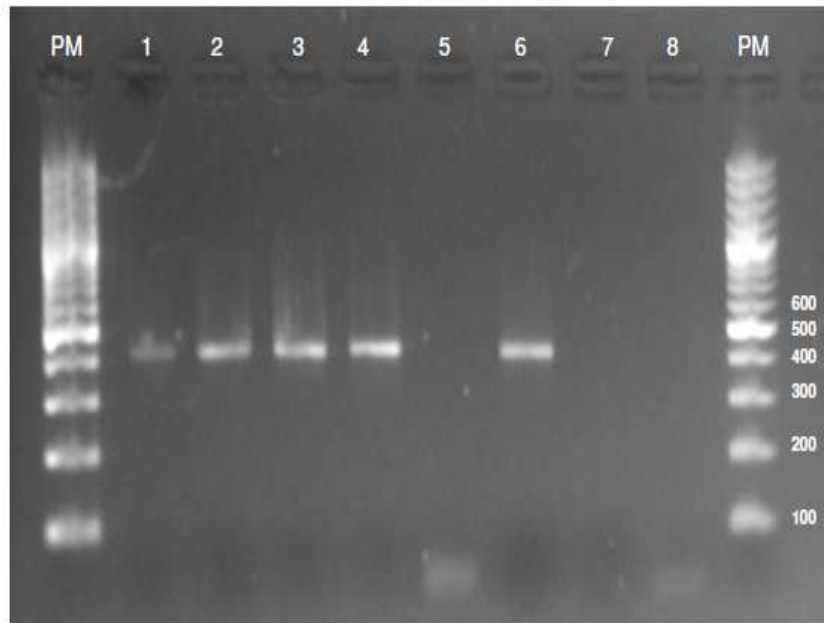


Figura 18. Productos de amplificación de la región ITS-1 de *C. insignis* por PCR (PanCulF/PanCulR)

Carriles 1 al 8: 1: *C. spp* (larva, Concentración ADN: 4,1 ng); 2-4: *C. insignis* (adulto, Concentración ADN: 7,3 ng), 5: *C. insignis* (adulto, Concentración ADN: 3,7 ng); 6-7: *C. insignis* (adulto, Concentración ADN: 6,1 ng), 8: Control negativo y PM de 100 pb.

La electroforesis en gel de agarosa al 2% (Figura 19) teñido con solución de GelRed muestra los productos de PCR amplificados con cebadores género-específicos para la subunidad I del gen mitocondrial COI en *C. insignis*. Para este marcador se trabajó con ADN genómico puro y diluciones 1/10 obtenidas a partir de ejemplares adultos y de larvas (sospechadas de ser *C. insignis*). Se obtuvieron productos de amplificación de 500 pb únicamente cuando se trabajó con ADN genómico puro. Nuevamente, el tamaño es acorde a los resultados esperados según bibliografía consultada (Lassen *et al.*, 2011).

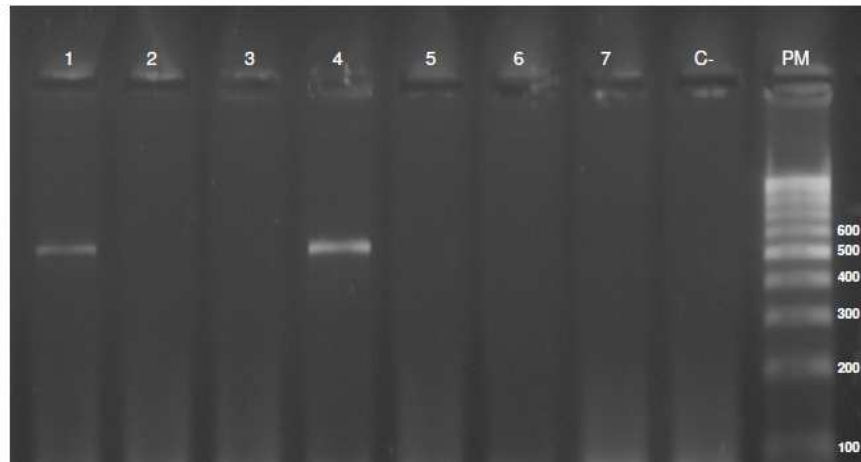


Figura 19. Productos de amplificación de la subunidad I del gen mitocondrial COI para *C. insignis* (CulCOI F/ CulCOI R).

Carriles 1 al 3: Larva *C. spp* (1: Concentración de ADN: 4,1 ng, 2-3: Concentración de ADN: 3,3 ng); Carriles 4 al 7: Adulto de *C. insignis* (4: Concentración de ADN: 7,3 ng, 5-7: Concentración de ADN: 6,1 ng), Carril 8: Control negativo y PM de 100 pb.

3.2.2- Análisis bioinformática de las secuencias ITS-1 de *C. insignis* y otras especies vectoras del BTV

La longitud de la secuencia alineada para *C. insignis* (MH566998) y las otras especies de *Culicoides* analizadas (incluidos los gap) fue de 557 pb.

El alineamiento revela que hay dos regiones altamente conservadas entre las bases 317 y 331 y entre las bases 333 y 350, respectivamente. Se identificó una región específica para *C. insignis* en la región comprendida entre las bases 79 y 107, a partir de la cual se diseñó el cebador sentido para la identificación de dicha especie (Figura 20).

3.2.3- Estandarización de las condiciones de PCR para la identificación de *C. insignis* y cálculo de la especificidad

Una vez sintetizado el cebador sentido se estandarizaron las condiciones de amplificación mediante PCR para la correcta identificación específica de *C. insignis* (Tabla XIII).

Tabla XIV. Detalle del cebador sentido diseñado para la identificación específica de *Culicoides insignis*, incluyendo secuencia, contenido de GC y Tm (Temperatura de melting o fusión)

Cebador	Secuencia de 5' a 3' F	Porcentaje de GC	Tm °C
Cul_insig F	GCTATTTGATTAGCAGCT TTGC	40,91	51,11

El gel de agarosa al 2% teñido con gel red (Figura 21) muestra la ausencia de productos de PCR en cada uno de los carriles correspondientes a las regiones ITS1 de las especies que no son *C. insignis* (*C. lahillei* y *C. debilipalpis*). De la misma manera, se observa una banda específica de 320 pb correspondiente al carril de *C. insignis*. Esto es acorde al tamaño esperado de acuerdo al análisis de las secuencias realizado.

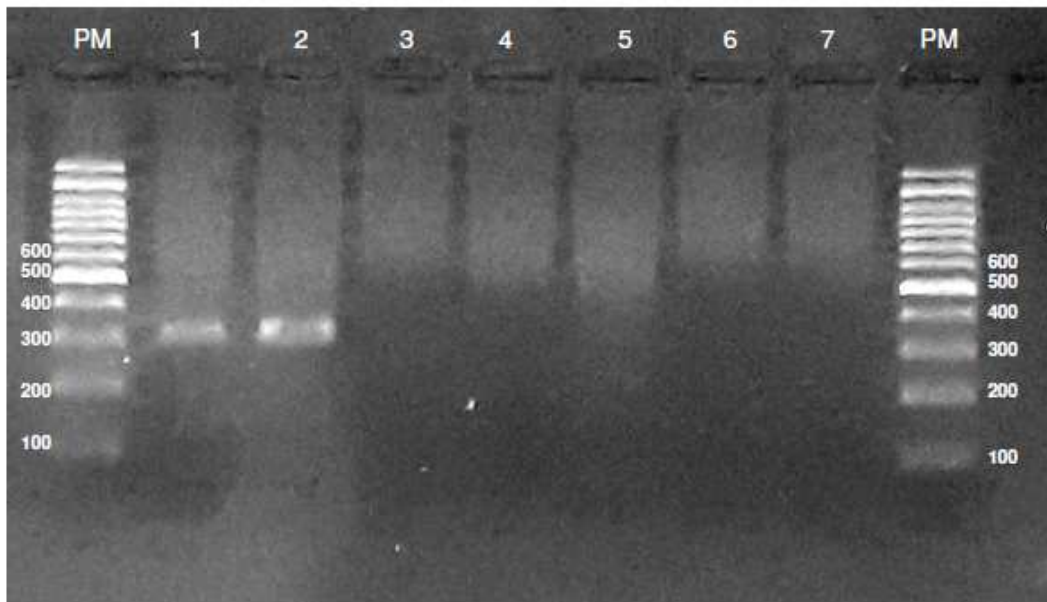


Figura 21. Productos de amplificación específica de región ITS-1 de *C. insignis* por PCR (Cul_insig F/PanCulR)

Carriles: 1-2: *C. insignis* (adulto, Concentración de ADN: 7,3 ng); 3-4: *C. lahillei* (adulto, Concentración de ADN: 6,2 ng); 5-6: *C. debilipalpis* (adulto, Concentración de ADN: 8,1 ng); 7: control negativo y PM de 100 pb.

Para calcular la especificidad del cebador se confeccionó una tabla de contingencia (Tabla XIV) a partir de las amplificaciones de 9 individuos de *C. insignis* y 3 individuos de la especie *C. debilipalpis*.

Tabla XV. Tabla de contingencia 2x2 para el cálculo de especificidad

Especies	Amplificación de regiones ITS-1 de <i>C. insignis</i>	
	Positivo	Negativo
<i>C. insignis</i>	8 (VP)	1 (FN)
<i>C. debilipalpis</i>	0 (FP)	3 (VN)

$$E = VN / (VN + FP) = 3 / (3 + 0) = 1$$

Acorde a los datos obtenidos al emplear la ecuación correspondiente la especificidad del método es de 100%.

3.2.4- Amplificación específica en larvas de *C. insignis*

Posteriormente, y considerando los resultados previos obtenidos con los cebadores género- específicos de ambos marcadores moleculares, se realizaron reacciones de PCR a partir del ADN extraído de larvas individuales, sospechadas de ser *C. insignis* utilizando el cebador sentido diseñado. Coincidentemente con los resultados obtenidos para el estado adulto, el gel de agarosa al 2 % mostró bandas específicas de 320 pb, no se observó amplificación en los carriles correspondientes a las larvas de *C. debilipalpis* (Figura 22). En ambos casos se trabajó con muestras de ADN genómico sin diluir, cuyas concentraciones fueron de 4,1 ng para *C. spp* y 4,5 ng para *C. debilipalpis*.

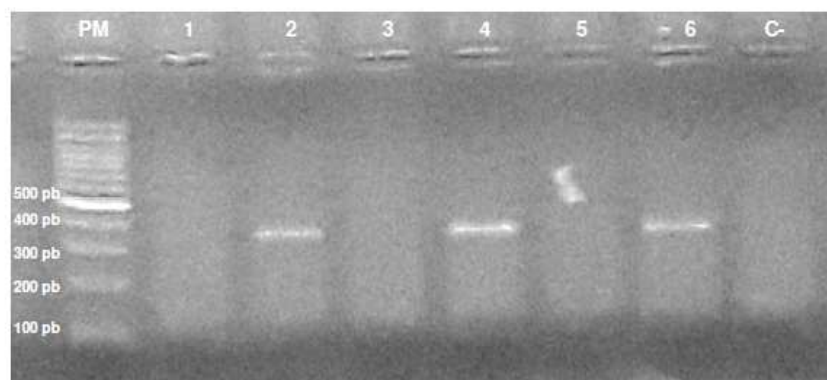


Figura 22. Productos de amplificación específica de región ITS-1 por PCR en larvas (*Cul_insig* F/PanCulR)

Carriles: 1,3 y 5: larva de *C. debilipalpis* (Concentración de ADN: 4,5 ng – ADN genómico puro); 2,4 y 6: *C. spp* (sospechada de ser *C. insignis*: Concentración de ADN: 4,1 ng- ADN genómico puro); 7: control negativo y PM de 100 pb.

Finalmente, para confirmar que efectivamente las larvas se corresponden a la especie *C. insignis*, los productos de amplificación obtenidos con los cebadores género específico fueron secuenciados y comparados con las secuencias ITS-1 obtenidas a partir de los adultos de *C. insignis* y se observó un 98% de identidad de nucleótidos entre ambas.

3.2.5- Análisis de distancia entre *C. insignis* y otras especies de *Culicoides*

Debido a que las bases de datos conocidas no cuentan con registros de secuencias de especies de *Culicoides* presentes en región Neotropical, para realizar el análisis filogenético del género se utilizaron secuencias publicadas y disponibles en el GenBank en adición a las secuencias ITS-1 obtenidas para *C. insignis*. Es importante remarcar que las secuencias utilizadas se corresponden a las más citadas por otros autores en la bibliografía de referencia (Li *et al.*, 2003; Cêtre-Sossah *et al.*, 2004; Perrin *et al.*, 2006; Nolan *et al.*, 2007; Pagés *et al.*, 2009; Ander *et al.*, 2012).

Las distancias entre las secuencias ITS-1 se calcularon con el método Kimura 2 Parámetros mediante el método Neighbor-Joining. La variación de la tasa entre los sitios se modeló con una distribución gamma (parámetro de forma = 1). Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA 5.10 (Tamura *et al.*, 2011).

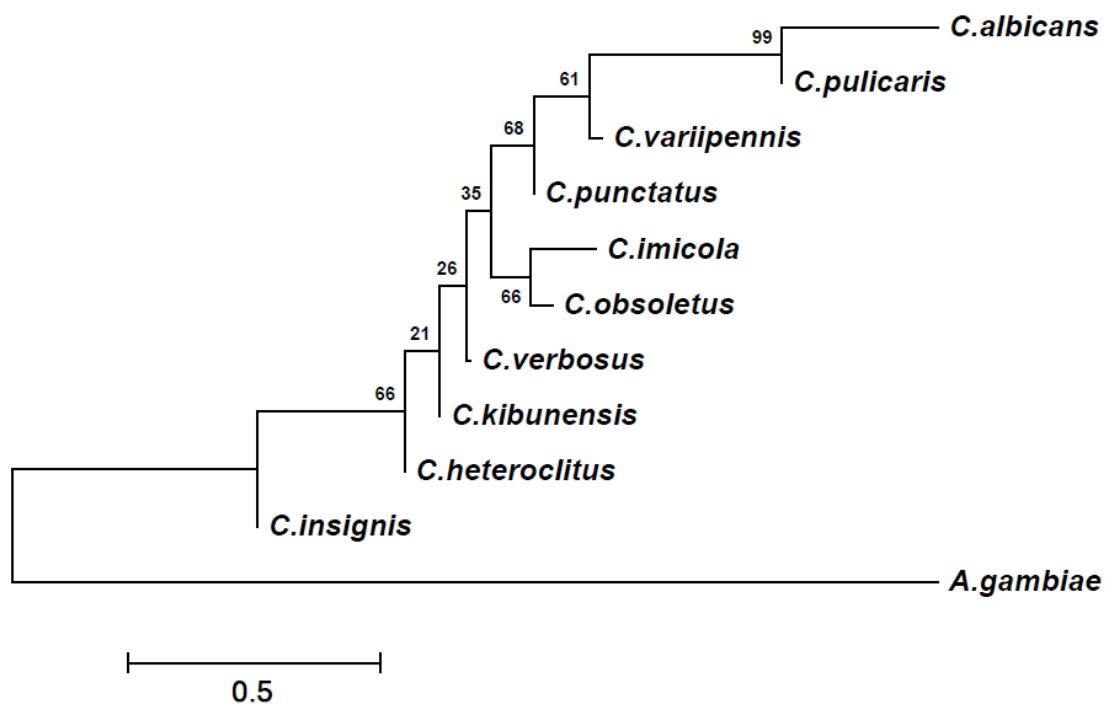


Figura 23. Árbol Neighbour-Joining basado en secuencias ITS-1 de *Culicoides*. Los valores de bootstrap se muestran junto a las ramas (2000 replicaciones, los nodos apoyan con mas del 50%)

El fenograma resultante (Figura 23) indica que, en relación con las especies analizadas, *C. insignis* es genéticamente más similar a *C. heteroclitus* Kremer & Callot, *C. kibunensis* Tokunaga y *C. verbosus* Tokunaga. Estos resultados coinciden con los datos obtenidos al comparar la secuencia de *C. insignis* con la base de datos no redundante del GenBank mediante la herramienta BlastN (Zhang *et al.*, 2000), donde se observó un 85% de identidad entre la secuencia *query* (*C. insignis*) y *C. kibunensis*, mientras que para *C. heteroclitus* y *C. verbosus* se obtuvo una identidad de 84% en comparación con *C. insignis* (Tabla XIII).

La Tabla XV presenta las secuencias con alineamiento significativo para *C. insignis* al ejecutar BlastN, se detalla el *score*, el *E-value* y el porcentaje de identidad. Se muestran solamente aquellos alineamientos con un porcentaje de identidad mayor a 80%.

Tabla XVI. Resultados obtenidos al ejecutar BlastN con la secuencia ITS-1 de *C. insignis*

Descripción	Máx score	E -value	Identidad	Nº Acceso
<i>C. kibunensis</i> 18S ribosomal RNA gene. ITS-1	311	9 e-81	85 %	AY861146
<i>C. heteroclitus</i> 18S ribosomal RNA gene. ITS-1	291	1e-74	84 %	AY861143
<i>C. verbosus</i> 18S ribosomal RNA gene. ITS-1	285	6e-73	84 %	AB462281

3.2.6- Obtención de la secuencia barcode para *C. insignis*

La secuencia COI final (*IN SUBMISSION: BankIt2161376*) (Figura 24) presentó una longitud de 508 pb y un porcentaje de GC de 33,27%.

Culicoides insignis cytochrome oxidase subunit I (COI) gene

```

1 atggaaattg attgcttcca attatacagc gagccccaga taattctttc cctcgaatat
61 ataataacg tttttttgac ttttaccccc ttcaattaca cttttactag cgataagatt
121 agttcaaaaa ggagcaggaa caggctgaac tgtatatccc cctctttcca gaaatategc
181 ccaggctggg gcctctgtag atttagctat tttttctctc catttagcgg ggatttcttc
241 tattttaggg gctgtaaatt ttattacaac gattattact atacgatctc atggtattac
301 attagcccg actccattat ttgtattatc agttttaatt acagcaattt tacttttatt
361 atctttacct gtattagccg gagcaattac tatattatta acgtatcgaa atattactac
421 ctcatcttt gaccagctg gaggtggaga tcctattctt taccacatt tattttgatt
481 ttttggccat ccagaagttt atatttta

```

Figura 24. Secuencia COI de *C. insignis* (*in submission: BankIt2161376*)

La Tabla XVI presenta las distancias genéticas interespecíficas calculadas a partir de las secuencias COI analizadas. Se observa que los valores fluctuaron en un rango mínimo de 0,198 (entre *C. insignis* y *C. obsoletus*) y un máximo de 0,294 (entre *C. insignis* y G2: *C. albicans*-*C. kibunensis*).

Tabla XVII. Distancias genéticas interespecíficas basadas en K2P para secuencias COI de *Culicoides*

	1	2	3	4	5	6
1. <i>C. pulicaris</i> - <i>C. punctatus</i>						
2. <i>C. albicans</i> - <i>C. kibunensis</i>	0.284					
3. <i>C. imicola</i>	0.279	0.293				
4. <i>C. obsoletus</i>	0.234	0.246	0.194			
5. <i>C. insignis</i>	0.246	0.294	0.231	0.198		
6. <i>C. newsteadi</i>	0.234	0.257	0.216	0.205	0.241	

En todos los grupos analizados se observan valores mayores a 0.02 (2 %), lo cual refleja que las especies agrupadas en el árbol corresponden a especies diferentes (Figura 24).

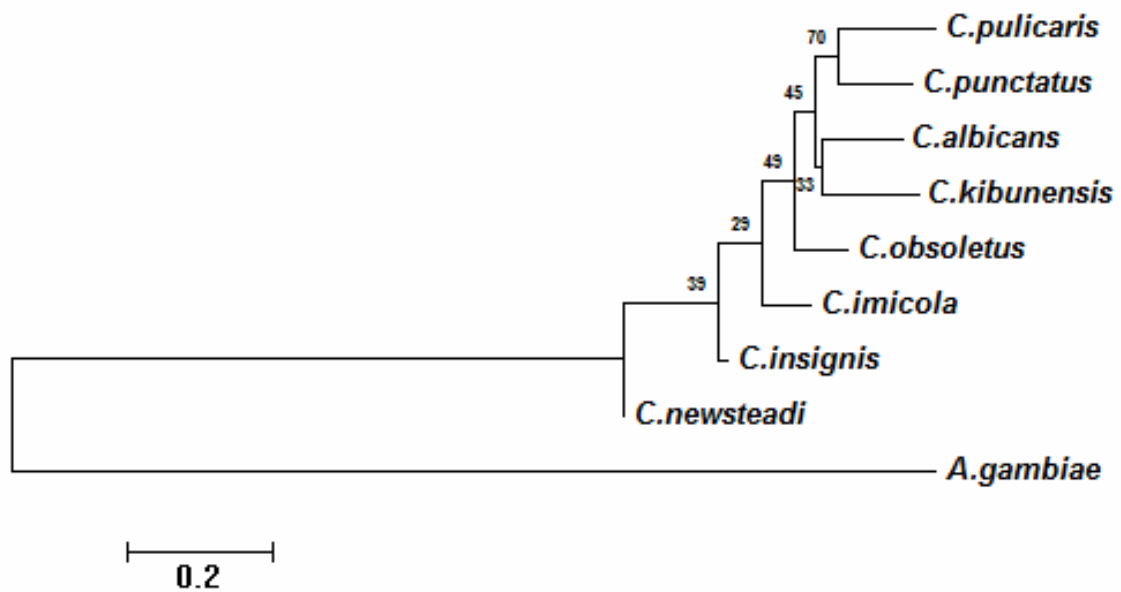


Figura 25. Árbol Neighbour-Joining basado en secuencias COI de *Culicoides*. Los valores de bootstrap se muestran junto a las ramas (2000 replicaciones, los nodos apoyan con mas del 50%)

CAPITULO 4. DISCUSIÓN

4.1- RIQUEZA ESPECÍFICA Y DISTRIBUCIÓN DE *CULICOIDES* EN MISIONES

Es notable la riqueza de especies de *Culicoides* presente en Misiones. Se recolectaron 22 de las 44 especies que están citadas para la Argentina (Ayala & Marino, 2018). En cuanto a la distribución de especies, la mayor biodiversidad fue encontrada en áreas selváticas y/o rurales de la región centro, y en zonas urbanas del sur de la provincia, con representantes de 18 y 12 especies, respectivamente.

En la zona norte de la provincia no se recolectaron ejemplares adultos mediante trampa de luz y los estados inmaduros encontrados en estos sitios no completaron su ciclo biológico en el laboratorio, por lo cual no pudieron ser identificados taxonómicamente y no fueron considerados en este trabajo. Esto puede deberse a que el número de muestreos en esta zona fue menor en comparación de los realizados en otros puntos de la provincia. Sin embargo y contrariamente a nuestros resultados, la zona norte de Misiones, especialmente el Departamento Iguazú presenta una gran diversidad de especies de *Culicoides* (Borkent & Spinelli, 2007; Campos *et al.*, 2011), la mayoría de estas especies registradas fueron recolectadas en la zona centro y sur de la provincia.

Los resultados obtenidos muestran que las especies que revisten importancia sanitaria en la Región Neotropical como *ser C. insignis* y *C. pusillus*, potenciales vectores del BTV (Greiner *et al.*, 1984, Tanya *et al.*, 1992, Mellor *et al.*, 2000; Borkent & Spinelli, 2007); *C. lahillei*, potencial vector de filariasis en el noroeste de la Argentina (Shelley & Coscarón 2001; Ronderos *et al.*, 2003a) y *C. paraensis* implicado en la transmisión del virus Oropouche (Ronderos *et al.*, 2003a; Borkent & Spinelli, 2007; Mourão *et al.*, 2009) están ampliamente distribuidas a lo largo de toda la provincia.

El mayor número de ejemplares de *C. insignis* fue encontrado en la ciudad de Posadas al sur de la provincia, donde, además, se recolectaron representantes de 11 especies de *Culicoides*, siendo *C. insignis* la más numerosa con el 93,3% del total. Los análisis de regresión lineal multivariada muestran que la humedad relativa media mensual fue la variable que mejor explicó la dinámica de *C. insignis* en el sitio de muestreo durante el período comprendido entre enero y diciembre de 2013 (Figura 12).

Culicoides insignis estuvo presente durante todos los meses del año con los picos de abundancia en junio y julio (Figura 10). En estos meses los valores registrados de temperatura ambiente fueron los más bajos, y el porcentaje de humedad presentó los valores más altos. Según datos aportados por el SMN la temperatura mínima y máxima registrada en la ciudad de Posadas fue de 16,8° C y 22° C, respectivamente; y el porcentaje de humedad presentó valores que oscilaron entre 74,6 a 81,7 %.

En coincidencia con estos resultados, Perruolo (2001) en Venezuela observó una relación inversamente proporcional entre la abundancia de *C. insignis* y las altas temperaturas, además colectó un gran número de ejemplares de esta especie durante los períodos de baja temperatura y abundante lluvia. A su vez, Veggiani Aybar *et al.* (2011), demostraron que la temperatura mínima y máxima y los niveles de precipitación acumulada fueron las variables climáticas más estrechamente relacionadas con la abundancia de *C. insignis* y *C. paraensis* en el noroeste de la Argentina. En este caso, *C. insignis* resultó más abundante durante el verano, con temperaturas elevadas. Con excepción de sus resultados obtenidos en La Florida (Tucumán) donde esta especie fue colectada en mayor número durante el otoño e invierno. Asimismo, Lager *et al.* (2004b) también observa “baja actividad” (presumiblemente baja densidad) de *C. insignis* a bajas temperaturas en el norte de la provincia de Corrientes.

La gran diferencia en cuanto al número de representantes de las distintas especies de este género en comparación al número de ejemplares de *C. insignis* coincide con los datos presentados por Silva *et al.* (2010) y Navarro *et al.* (2018), donde *C. insignis* también fue la especie más abundante representando un 93% y 94,8% del total en sus colectas realizadas con trampas CDC en el Estado de Pará (Brasil) y en la localidad de Santa Rosa de Lima (Perú), respectivamente. Estos datos sugieren una gran atracción de esta especie por las fuentes de luz, reforzando los datos aportados por González *et al.* (2016), quienes demostraron la preferencia de los *Culicoides*, y ceratopogónidos en general, por las trampas de luz. Asimismo, Meiswinkel & Elbers (2016) coinciden en el uso de trampas de luz como herramienta de colecta de *Culicoides*. Estos autores demostraron que niveles de intensidad de luz por encima de 0 lux genera un impacto adverso en la efectividad de las trampas de luz, por lo cual esta herramienta solo es útil para coleccionar especies de *Culicoides* crepusculares, no así para aquellas especies que presentan picos de máxima actividad durante el día. Coincidentemente, en nuestros

resultados las especies mejor representadas durante las colectas realizadas con trampas de luz (*C. insignis* (n=2952) y *C. limai* (n=189)) presentan actividad crepuscular (Wirth & Blanton, 1959; Borkent & Spinelli, 2007). Por otro lado, *Culicoides paraensis* también fue colectado con trampas de luz en números representativos (n=50), sin embargo es reconocido por su carácter antropofílico y por entrar a las casas en el transcurso del día para alimentarse de los humanos (Wirth & Blanton, 1959; Sherlock & Guitton, 1964 D).

Con respecto a los tipos de trampas de luz utilizadas en los monitoreos de *Culicoides* alrededor del mundo, Probst *et al.* (2015) compararon 4 tipos de trampas de luz para la colecta de *Culicoides* y sus resultados indican que las trampas Onderstepoort (diseñadas en el Instituto de Ingeniería Agrícola de Sudáfrica) colectan significativamente más ejemplares que las trampas de luz tipo CDC.

En este trabajo se utilizó trampas de luz tipo CDC sin el agregado de CO₂, que podría incrementar la eficiencia de las mismas y la colecta de especies de *Culicoides* (Venter *et al.*, 2015). Nuestros resultados indican que *C. insignis* fue la especie mas abundante en todas las colectas realizadas a lo largo de la provincia de Misiones. Con 3007 ejemplares representa el 83,7% del total de especímenes recolectados, lo cual está en concordancia con los resultados publicados en estudios previos de Ronderos *et al.* (2003b) en la zona de afectación de la represa Yacyretá, Gorch *et al.* (2001) y Lager *et al.* (2004b) en las provincias de Corrientes y Misiones.

Considerando la importancia sanitaria que reviste esta especie como posible vector del BTV (Mellor *et al.*, 2000; Borkent & Spinelli, 2007) es importante realizar un monitoreo de la enfermedad en la zona, no solo por la abundancia del vector en los sitios de muestreo, sino también porque el virus fue aislado en el noreste argentino a partir de bovinos sin evidenciar síntomas de la enfermedad (Gorch *et al.*, 2001; Lager, 2004a). Es necesario establecer los límites del área infectada, las especies de *Culicoides* involucradas en la transmisión, y reconfirmar los serotipos circulantes en la Argentina (Ronderos *et al.*, 2003a).

Por otro lado, *Culicoides lahillei*, *C. debilipalpis* y *C. paraensis* son considerados un problema para el confort humano debido a la molestia que ocasionan sus picaduras en el noreste de Argentina (Borkent & Spinelli, 2007). En este trabajo se colectó un total de 41 ejemplares de *C. lahillei*, 48 de *C. debilipalpis* y 66 de *C. paraensis*, como así

también, se identificaron y caracterizaron los sitios de cría de éstas últimas dos especies citadas. El mayor número de ejemplares de *C. debilipalpis* fue encontrado en zonas silvestres con abundante vegetación al sur de la provincia. *Culicoides paraensis* fue muy abundante en áreas rurales en la zona centro de Misiones, mientras que *C. lahillei* fue recolectado en ambientes selváticos considerados de recreación y turísticos en la zona del Alto Paraná, debido a su elevado número en el lugar de muestreo algunos especímenes fueron recolectados por cebo humano.

Según Ronderos *et al.* (2003a), en la Argentina se constató cuadros asmáticos típicos en personas sin antecedentes alérgicos, luego de múltiples picaduras producidas por numerosos ejemplares de *Culicoides* sp., sin embargo no hay reportes oficiales sobre la molestia sanitaria que representan los *Culicoides* en la región. A diferencia de lo que ocurre, por ejemplo, en el Departamento de Boyacá, Colombia, donde Santamaría *et al.* (2008) identificaron áreas afectadas por la molestia sanitaria causada por las picaduras de *Culicoides* a humanos, reconociendo a *C. pachymerus* Lutz como la especie responsable de los problemas dermatológicos de esa región. De igual manera, Sherlock & Guitton (1963 I) demostraron que *C. paraensis* es el agente causal de la dermatozoonosis reportada en el Estado de Bahía, Brasil.

Considerando que nuestra provincia es uno de los puntos del país con mayor flujo turístico nacional e internacional (Gran Atlas de Misiones, 2012), es importante reconocer las especies que pican a los humanos, su distribución y estacionalidad para así determinar las zonas y épocas de riesgo de sufrir posibles ataques.

Además, *Culicoides paraensis* es el principal vector de la Fiebre de Oropouche en zonas urbanas (Mellor *et al.*, 2000; Borkent & Spinelli, 2007). Su importancia es hasta ahora potencial en la Argentina, debido a la abundancia del vector en el país y a las epidemias en zonas selváticas de países vecinos. Se requieren estudios para dilucidar aspectos biológicos relevantes de esta especie en nuestra zona, y, en caso de ser necesario, poner en marcha un programa de vigilancia para brindar herramientas de control en caso de la aparición de problemas sanitarios (Ronderos *et al.*, 2003a).

Lo mismo ocurre con *C. lahillei*, considerado el principal vector de filariasis, cuyo vector secundario es *C. paraensis* (Shelley & Coscarón, 2001; Ronderos *et al.*, 2003a). Si bien los focos de mansonelosis en la Argentina están restringidos al noroeste del país

(Ronderos *et al.*, 2003a, Veggiani Aybar *et al.*, 2011), es importante confirmar el rol epidemiológico (o no) de estas especies en nuestra región.

4.2- ESTADOS INMADUROS

El conocimiento taxonómico acerca de los adultos del género *Culicoides* es muy avanzado en comparación a lo poco que se conoce sobre sus estados inmaduros (Ronderos *et al.*, 2002). En la región Neotropical solamente un porcentaje menor al 15 por ciento del total de las especies citadas se ha descrito en alguno de sus estados inmaduros (Borkent & Spinelli, 2007).

Hay varios trabajos sobre sitios de cría de *Culicoides* en otras partes del mundo (Braverman, 1978; Kline & Greiner, 1985; Mercer *et al.*, 2003; Uslu & Dik, 2007; Jenkins & Young, 2010; Carrasquilla *et al.*, 2010); sin embargo el conocimiento de los habitats de las especies presentes en la región Neotropical es muy limitada (Ronderos *et al.*, 2008; Ronderos *et al.*, 2010). Wirth & Blanton (1959) describieron los sitios de cría de solamente 15 de las 88 especies de *Culicoides* reportadas para Panamá, algunas biológicamente asociadas a la flora local. Asimismo, Vitale *et al.* (1981), también en Panamá, aportaron información sobre los habitats arboreos donde crían *Culicoides*. Williams (1964) reportó los habitats larvales de 24 especies en Trinidad, y Barbosa (1952) describió los sitios de cría de las especies pertenecientes al grupo *debilipalpis* en Brasil.

En nuestros resultados, la fitotelmata resultó ser el habitat más productivo para el desarrollo de las los *Culicoides*. Sin embargo, el conocimiento de los sitios de cría de ceratopogónidos en fitotelmata de la Argentina es escaso, como así también el número de descripciones de estados preimaginales que fueron encontradas en este tipo de hábitat (Campos *et al.*, 2011). Están descritos los estados inmaduros de *C. charruus* colectados en axilas de plantas herbáceas (Ronderos *et al.*, 2008b), *C. debilipalpis* colectados en huecos de árbol (Ronderos *et al.*, 2010) y *C. bambusicola* colectados en internados de tacuara (Ronderos & Spinelli, 2000; Campos *et al.*, 2011).

Puntualmente en la provincia de Misiones, estudios previos realizados por Campos *et al.* (2011) en fitotelmata del Parque Nacional Iguazú en la provincia de Misiones encontraron que *C. paraensis* y *C. bambusicola* crían en huecos de árboles.

Coincidentemente con esas observaciones encontramos *C. debilipalpis* en huecos de árbol, principalmente de plantas de mango (*Mangifera sp.*). *Culicoides bambusicola* fue colectado en los internados de tacuaras, y *C. guarani* en huecos de árbol de higuerón (*Ficus spp.*); esto permitió la descripción por primera vez del estado pupal y de los machos adultos de esta especie (Ayala *et al.*, 2015) como así también la caracterización de sus criaderos en el Departamento Capital de Misiones.

De acuerdo a Uslu & Dik (2006), las especies de interés veterinario se encuentran principalmente en lodo de potreros, excremento de animales u otra materia orgánica a una profundidad de 2,5 cm en el sustrato, y el número de larvas y pupas disminuye a medida que aumenta la profundidad. Coincidentemente con esto, los especímenes colectados a partir de sustrato húmedo en el suelo, en este caso *C. paraensis* y *C. debilipalpis* fueron hallados a una profundidad no mayor a 2,5 cm. Asimismo, las larvas halladas en heces y barro de un potrero con ganado, consideradas como *C. insignis*, fueron encontradas a una profundidad de 3,5 a 5 cm.

En sus trabajos realizados en Florida (EUA), Kline & Greiner (1985) encontraron larvas de *C. insignis* en lodo contaminado por efluentes de salas de ordeño, márgenes de estanques con vegetación, zonas fangosas en pastos y en el margen de pequeñas zanjas de drenaje. A su vez, Carrasquilla *et al.* (2010) identificó en Colombia los sitios de cría de especies de *Culicoides* con importancia sanitaria, entre ellas *C. insignis*, a partir de microhábitats formados por acumulación de agua de lluvia y barro.

En nuestro país, Marino *et al.* (2013) hallaron pupas de *C. insignis* en barro acumulado en la zona litoral de un arroyo en la provincia de Corrientes. Coincidentemente con esto, y pese al elevado número de adultos recolectado de ésta especie, hemos encontrado solamente una pupa de *C. insignis* en un ambiente muy similar al descrito por Marino *et al.* (2013), en un arroyo ubicado al sur de la provincia de Misiones. El bajo número de estados inmaduros de esta especie demuestra la difícil ubicación de los criaderos en nuestras zonas de trabajo, y el escaso número de especímenes encontrados en estos sitios de cría podría indicar que estos criaderos son ocasionales.

Salvo la información aportada por Marino *et al.* (2013), no se conocen los sitios de cría de *C. insignis* en la región, y tampoco hay trabajos recientes sobre ecología o dinámica poblacional de esta especie.

A pesar que algunas de las especies presentes en la región poseen sus estados inmaduros descritos (Wirth & Blanton, 1959; Diaz *et al.*, 2005; Borkent & Spinelli, 2007; Ronderos *et al.*, 2008; Ronderos *et al.*, 2010, Ayala *et al.*, 2015), la ausencia del conocimiento implica que las larvas y/o pupas colectadas no pudieron ser identificadas a nivel de especie a partir de los caracteres morfológicos observados y en todos los casos fue necesario esperar la emergencia de los adultos para confirmar la identificación específica.

De los 87 especímenes colectados como inmaduros, un total de 6 larvas de tercer y cuarto estadio, no completaron su ciclo vital y por lo tanto no pudieron ser identificadas. El mantenimiento de los estados preimaginales en el laboratorio implica la observación diaria de las larvas (preferentemente bajo la lupa para verificar que siguen con vida), el control de la calidad del agua donde fueron depositadas, y el agregado constante de nutrientes. Además las larvas son muy sensibles a los cambios de temperatura, si bien, es difícil mantener una temperatura constante, particularmente en épocas frías, la cría se realizó en un rango de temperatura que osciló entre los 23° C y 27° C. La cría en laboratorio resulta un trabajo arduo y en ocasiones tedioso, y puede extenderse por un período de 35 días, según experimentos realizados por Ronderos & Diaz (2002). De acuerdo a nuestros resultados hemos obtenido 60% de eficacia en la cría de los estados inmaduros de *Culicoides*, los cuales completaron su ciclo biológico en un período no mayor a 20 días.

La información obtenida en este trabajo sobre la ecología y sitios de cría de *Culicoides*, permitirá, en caso de ser necesario, tomar medidas de control para las especies consideradas vectores de enfermedades.

4.3- BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA A *CULICOIDES*

La identificación específica de *Culicoides* se ha basado en caracteres morfológicos (Wirth & Blanton, 1959; Spinelli *et al.*, 2005; Borkent & Spinelli, 2007), lo que suele resultar tedioso y consumir mucho tiempo debido al tamaño que presentan los ejemplares adultos que oscilan entre 1,5 a 3 mm (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004)

Con la aparición de las técnicas de biología molecular, especialmente la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el secuenciamiento automático, el estudio del genoma en insectos, principalmente aquellos considerados vectores de enfermedades, se ha

transformado en un paso importante en la resolución de varios conflictos taxonómicos (Bejarano, 2001).

Para el estudio molecular de los *Culicoides* se han utilizado diferentes marcadores tales como las secuencias del primer espaciador transcrito interno (ITS-1) del ADNr (Li *et al.*, 2003; Cêtre-Sossah *et al.*, 2004; Perrin *et al.*, 2006; Stephan *et al.*, 2009), segundo espaciador transcrito interno (ITS-2) del ADNr (Gomulski *et al.*, 2005; Gomulski *et al.*, 2006); gen de la Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) del ADN mitocondrial (Pagés *et al.*, 2009; Augot *et al.*, 2013, Lassen *et al.*, 2011; Ander *et al.*, 2012; Stur & Borkent, 2014), y la combinación de ITS-1, ITS-2 y 18S (Kiehl *et al.*, 2009).

Para diferenciar una especie por medio de herramientas moleculares, es importante hallar una secuencia del genoma que sea específica para dicha especie y no presente una alta tasa de mutaciones. Las regiones ITS como marcadores moleculares, tienen características únicas que lo hacen un blanco ideal para su uso en la identificación de especies (Elder & Turner, 1995; Collins & Paskewitz, 1996). Estudios previos demostraron que esta región permitió la detección de otras especies vectoras del BTV, como ser *C. imicola* (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004) y *C. dewulfi* (Stephan *et al.*, 2009).

En relación a la estandarización del método de extracción de ADN utilizado, y en comparación a otros grupos de dípteros vectores de enfermedades como son los mosquitos para los cuales existen diversos protocolos de extracción descriptos (Gaillard & Strauss, 1990; Kampen *et al.* 2003; Linton *et al.*, 2007; Rosero *et al.*, 2010) o flebótomos (Santamaría *et al.*, 2005; Golczer & Arrivillaga, 2008), no se conoce ningún protocolo convencional para *Culicoides*. En la mayoría de los trabajos publicados de biología molecular aplicada a este género se emplean paquetes comerciales de extracción y purificación de ADN (Li *et al.*, 2003; Cêtre-Sossah *et al.*, 2004; Perrin *et al.*, 2006; Pages *et al.*, 2009; Stephan *et al.*, 2009, Ander *et al.*, 2012; Lassen *et al.*, 2012). Garros *et al.* (2014) considera que la extracción de ADN con kits comerciales genera gastos elevados, pero a su vez permite una elevada sensibilidad y especificidad, en particular cuando el número de muestras es grande. Aun así, este autor recomienda el uso de resina Chelex, como una alternativa efectiva y económica para la extracción de ADN en *Culicoides*. Sugiere también que los métodos de extracción de ADN impactan en la sensibilidad de los ensayos así como el tipo de muestra y su conservación,

indicando que es recomendable conservar los ejemplares en alcohol 70% para su posterior análisis molecular.

Debido a la importancia de una correcta identificación taxonómica a partir de la observación de algunos caracteres morfológicos presentes en la cabeza, alas y genitalia (Borkent & Spinelli, 2007), estas estructuras fueron montadas en preparaciones microscópicas con el fin de conservar un “voucher” al cual asociar las secuencias obtenidas posteriormente. En este contexto, para el estado adulto se estandarizó un protocolo de extracción de ADN genómico a partir de las modificaciones realizadas al protocolo de Doyle & Doyle, (1987). Para ello se utilizó fragmentos de tórax y abdomen de hembras individuales previamente identificadas. En este protocolo la purificación del ADN y remoción de proteínas se realizó con cloroformo. Posteriormente, para el estado larval se realizaron nuevas modificaciones al protocolo original, se utilizó precipitación salina para la remoción de proteínas lo cual permitió estandarizar un método de extracción de ADN acorde a la delicadeza y composición de la muestra inicial.

Un paso importante en el procedimiento de extracción es la precipitación de proteínas con acetato de potasio (AcK) y el posterior tiempo de incubación en hielo (Rosero *et al.*, 2010). En nuestro trabajo el período de incubación en hielo fue de 30 min, sin embargo, en la literatura se han reportado protocolos que utilizan variados tiempos de incubación con el AcK: 10 min (Linton *et al.* 2001; Bisset *et al.* 2005), 15 min (Beebe *et al.* 2000; Nodarse *et al.* 2004), 30 min (Kampen *et al.* 2003) y 60 min (Golczer y Arrivillaga 2008; Rosero *et al.*, 2010).

La cuantificación del ADN extraído de las muestras de *Culicoides* utilizadas presenta valores alejados de los valores esperados para una muestra de ADN “pura”. Esto puede deberse principalmente al protocolo de extracción utilizado, ya que la presencia de residuos de los solventes orgánicos pueden contaminar el producto de extracción e inhibir la amplificación (Rantakokko-Jalava y Jalava, 2002). En el caso de las larvas, donde se trabajó con solución salina, Rosero *et al.* (2010) evidenciaron que la mayor concentración de ADN se obtuvo al realizar incubación en hielo durante una 1 h luego del agregado de AcK.

Aún así, hemos obtenido ADN amplificable para ambos marcadores moleculares utilizados sin necesidad de utilizar ARNasas o paquetes comerciales de purificación del ADN.

4.4- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *CULICOIDES INSIGNIS*

Las secuencias de *Culicoides* publicadas y disponibles en base de datos conocidas provienen de estudios realizados en Europa, Japón y Sudáfrica, y sobre las especies allí presentes. Genbank cuenta con 35930 secuencias del género *Culicoides*, siendo 4655 secuencias de COI y 127 secuencias de ITS-1 y 156 de ITS-2 (National Center for Biotechnology Information), de las cuales ninguna se corresponde a especies de *Culicoides* presentes en la región Neotropical (Borkent & Spinelli, 2007), salvo dos aislamientos del gen ribosomal 28S (números de acceso KF286360 y KF286359) de *C. paraensis*, en el marco de un estudio sobre el virus Oroupoche realizado por investigadores de Francia.

No hay información disponible de secuencias nucleotídicas de *C. insignis* pese a la importancia sanitaria que reviste como vector del BTV en el neotrópico.

Debido a la carencia de información sobre el ADN de las especies de *Culicoides* presentes en la región Neotropical, al inferir las relaciones filogenéticas en base a las secuencias ITS-1 entre *C. insignis* y otras especies de *Culicoides* del mundo, se observa cómo *C. insignis* constituye un clado separado de las demás especies analizadas (Figura 23).

Como era de esperarse, no hay agrupamientos entre las especies tomadas del GenBank y *C. insignis*; el fenograma resultante refuerza los resultados aportados en la búsqueda de identidad de secuencias realizados con la herramienta BlastN donde *C. insignis* presenta mayor porcentaje de identidad de secuencia ITS-1 con las especies *C. kibunensis*, *C. verbosus* y *C. heteroclitus* (Tabla XV).

Debido a las diferencias en cuanto a homología y similitud entre las secuencias utilizadas, sea por diferencias entre nucleótidos o por su distribución geográfica, el objetivo de nuestro trabajo no fue realizar un estudio filogenético, sino simplemente identificar la posición de *C. insignis* en relación con otras especies de *Culicoides* estudiadas e identificadas en base a su ADN alrededor del mundo. Constituyendo el

primer paso para posteriores estudios filogenéticos entre las especies de *Culicoides* presentes en la región Neotropical.

Por otro lado, la utilización de genes mitocondriales para estudios taxonómicos en insectos de importancia médica ha tenido un auge durante los últimos años (Bejarano, 2001). El haplotipo mitocondrial obtenido para *C.insignis* (Figura 24) refuerza la identificación realizada en base a caracteres morfológicos. Asimismo los valores de distancia genética entre las especies analizadas demuestran que esta secuencia es suficiente para discriminar entre especies del género *Culicoides*. Esto se debe a que en el contexto del código de barras de la vida (Hebert *et al.*, 2003), y especialmente en los insectos, los grupos que tengan un distancias superiores a 0.02 es decir 2% son consideradas especies diferentes. En nuestros resultados observamos que todas las especies comparadas con *C. insignis* presentaron distancias que varían en el rango de 0,198 a 0,294 (Tabla XVI).

El aporte de nuevas herramientas desde la óptica molecular contribuirá significativamente para alcanzar una adecuada identificación específica particularmente en el caso de las especies crípticas (Garros *et al.*, 2014). Cabe destacar que *C. insignis*, está sospechado de ser un complejo de especies (Spinelli, com. pers.); sin embargo en este trabajo no se observaron variaciones entre las secuencias obtenidas para ITS-1 y COI, las cuales validaron la identificación taxonómica realizada en base a caracteres morfológicos.

Hemos diseñado un cebador sentido a partir de una secuencia específica de la región ITS-1 de *C. insignis*, que no genera productos de amplificación en otras especies de *Culicoides* analizadas. Con una especificidad del 100% el método optimizado permitió la detección molecular de *C. insignis* en ejemplares adultos y estados inmaduros colectados en la provincia de Misiones. Esta herramienta diseñada puede ser comercializada como un kit para la detección específica de uno de los vectores principales del BTV, y ser utilizado en monitoreos de rutina o de vigilancia epidemiológica de estas especies. Esto facilitará el proceso de identificación taxonómica agilizando el tiempo que implica observar ciertos caracteres diagnósticos en los especímenes recolectados, pudiendo ser utilizado incluso en estados inmaduros.

En nuestro trabajo combinamos la identificación morfológica y molecular de los especímenes de *C. insignis*. Además pudimos confirmar la identificación específica de

las larvas sin clasificar, lo cual representa un aporte fundamental al estudio de la taxonomía y sistemática de los *Culicoides*.

Nuestros resultados representan los primeros aportes de biología molecular al estudio del género en la región. De esta manera, *C. insignis* constituye la primera especie del género *Culicoides* estudiada a nivel genético en la región Neotropical de la Argentina.

CAPITULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1- CONCLUSIONES

1. Fue posible desarrollar una herramienta rápida y específica para la detección de *Culicoides insignis* mediante la secuenciación y el diseño de un cebador a partir de la región ITS-1 del ADN ribosomal nuclear.
2. La secuencia barcode obtenida para *C. insignis* es válida para diferenciar esta especie de otras especies de *Culicoides*.
3. El empleo de herramientas moleculares y bioinformáticas aportó nuevos datos al estudio de *C. insignis*, principal vector del BTV en la región Neotropical.
4. El cebador diseñado para la identificación específica de *C. insignis* es aplicable en sus estados preimaginales.
5. El trabajo de campo permitió actualizar el estado de conocimiento de las especies de *Culicoides* en la provincia de Misiones: se agregan 3 nuevas citas formales para la provincia y una nueva cita para la Argentina. Además, se provee la descripción de los adultos macho y las pupas de *Culicoides guarani* Ronderos & Spinelli y la descripción de una nueva especie de *Culicoides*.
6. Este trabajo representa los primeros aportes de biología molecular aplicados a los *Culicoides* presentes en la región Neotropical de la Argentina.

5.2- RECOMENDACIONES

1. Aplicar este método de identificación molecular a otras especies de *Culicoides* consideradas vectores de enfermedades en la región.
2. Obtener secuencias *barcode* para otras especies de *Culicoides* presentes en la región y conformar una biblioteca digital de secuencias para complementar la identificación basada en caracteres morfológicos.
3. Adaptar esta técnica a otros estados del ciclo de vida de los *Culicoides*.
4. Incorporar datos ecológicos a los análisis bioinformáticos realizados en *Culicoides*.

5. Continuar con el monitoreo de *C. insignis* y otras especies de importancia sanitaria en la región, especialmente en los períodos registrados de mayor abundancia poblacional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ander, M., Troell, K. & Chirico, J., “Barcoding of biting midges in the genus *Culicoides*: a tool for species determination”. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(3): 323–331. 2012.
2. Augot, D., Ninio C., Akhoundi M., Lehrter V., Couloux A., Jouet D. & Depaquit J., Charracterization of two cryptic species : *Culicoides stigma* and *C. parroti* (Diptera: Ceratopogonidae) based in barcode regions and morphological description. *Journal of Vector Ecology*, 28:1-6. 2013.
3. Ayala, M.M., Walantus, L.H. & Zapata, P.D., Estandarización de un protocolo de extracción de ADN para la amplificación de regiones ITS-1 para la caracterización molecular de *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae). Artículo en acta de VIII Congreso Argentino de Entomología, San Carlos de Bariloche, Argentina. Pág 371. 2012.
4. Ayala, M.M., Spinelli, G.R.; Funes, A. & Ronderos, M.M., Additional notes on biting midges from the subtropical forest of northeastern Argentina (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa*, 3941: 79-90. 2015.
5. Ayala, M.M., Martí, D.A. & Spinelli, G. R., Estandarización de de una técnica de extracción de ADN a partir de larvas individuales de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). Artículo en acta de X Congreso Argentino de Entomología, Mendoza, Argentina. Pág 316. 2018.
6. Ayala, M.M. & Marino, P.I., New records of biting midges of the genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) in Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 77 (2): 36-38. 2018.
7. Barbosa, F.A.S., Novos sitios para o conhecimento dos *Culicoides* neotropicales (Diptera: Heleide). Univ. Recife Tesis, Imprensa Industrial Recife, pp. 1-21. 1952.
8. Bear, C.B., Hamm, D.M. & Coliins, F.H., The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Molecular Biology*, 2: 103-124. 1993.

9. Beebe, N.W., Cooper, R.D. Morrison, D.A. & Ellis, J.T. A Phylogenetic Study of the *Anopheles punctulatus* Group of Malaria Vectors Comparing rDNA Sequence Alignments Derived from the Mitochondrial and Nuclear Small Ribosomal Subunits. *Molecular Phylogenetics and Evolution*,17(3): 430-436. 2000.
10. Bejarano, E.E., Nuevas herramientas para la clasificación taxonómica de los insectos vectores de leishmaniosis: utilidad de los genes mitocondriales. *Biomédica*, 21: 182–191. 2001.
11. Bisset, J.A., Rodriguez, M. & De Armas, Y., Comparación de 2 poblaciones de mosquitos *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba con diferente conducta de reposo. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 57(2): 143-150. 2005.
12. Black, W. & Munstermann, L., Molecular taxonomy and Systematics of arthropod vectors. En: Barry J. Beaty & William C. Marquardt (Eds). *The Biology of Disease Vectors*. Capítulo 26, pp. 438-470. 1996.
13. Borkent, A., 10. Ceratopogonidae. In Marquardt, W.C. (ed.): *Biology of disease vectors*. 2º edition. Elsevier Academic Press, 113:126. 2004.
14. Borkent, A. & Spinelli, G.R., Biodiversidad Acuática en América Latina. Neotropical Ceratopogonidae (Diptera: Insecta). Vol. 4: 1-200. 2007.
15. Borkent, A., The Pupae of the Biting Midges of the World (Diptera: Ceratopogonidae), With a Generic Key and Analysis of the Phylogenetic Relationships Between Genera. *Zootaxa*, (1): 001–327. 2014.
16. Borkent, A., World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). 2016. Available from: <http://www.inhs.uiuc.edu/research/FLYTREE/CeratopogonidaeCatalog.pdf> (verified 28 Nov 2017).
17. Braverman, Y., Characteristics of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) breeding places near Salisbury, Rhodesia. *Ecological Entomology*, 3: 163-170. 1978.
18. Burgueño, M., García-Bastos, J. & González-Buitrago, J., Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Medicina Clínica* (Barcelona), 104: 661-670. 1995.

19. Cabrera, A.L., Esquema fitogeográfico de la República Argentina. *Revista del Museo de La Plata, nueva serie*, 8 (Secc. Bot.): 87-168. 1953.
20. Cabrera, A.L., Fitogeografía de la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 14 (1-2): 1-42. 1971.
21. Campos, R. E., Spinelli, G. R. & Mogi, M., Culicidae and Ceratopogonidae (Diptera: Nematocera) inhabiting phytotelmata in Iguazú National Park, Misiones Province, subtropical Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 70 (1-2): 111-118. 2011.
22. Carrasquilla, M.C., Guhl, F., Zipa, Y., Ferro, C., Hernando Pardo, R., Cabrera O.L. & Santamaría, E., Breeding sites of *Culicoides pachymerus* Lutz in the Magdalena River basin, Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(2): 216-219. 2010.
23. Cazorla Perfetti, D., Catálogo de las especies de Ceratopogonidae (Diptera: Nematocera) registradas para Venezuela y su importancia agro-ecológica y sanitaria. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. Vol. 26 (4): 395-408. 2014.
24. Cêtre-Sossah C., Baldet T., Delecqle J.C., Mathieu, B., Perrin A., Grillet C. & Albina, E., Molecular detection of *Culicoides spp.* and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Vet. Res.* 35:325-337. 2004.
25. Collins, F.H., Paskewitz, S.M., A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect. Mol. Biol.* 5, 1-9. 1996.
26. Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C.W., InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2008.
27. Díaz F., Ronderos, M. & Spinelli, G., The immatures of the Neotropical species *Culicoides venezuelensis* Ortiz and *Mirsa* (Diptera: Ceratopogonidae). *Transaction of the American Entomology Society*, 131: 375-385. 2005.
28. Dougall, A., Alexander, B., Holt, D., Harris, T., Sultan, A., Bates, P., Rose, K., Walton, S., Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *International Journal for Parasitology*, 41(5):571-579. 2011.

29. Doyle J.J. & Doyle J.L., A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15. 1987.
30. Elder J.F., Turner B.J., Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes, *The Quarterly Review of Biology*, 70: 297–320. 1995.
31. Gaillard, C., & Strauss, F. 1990. Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Research*, 18: 378. 10. 1990.
32. Garros C., Balenghien T., Carpenter S., Delecolle J.C., Meiswinkel R., Pedarrieu A., Rakotoarivoni I., Gardes L., Golding N., Barber J., *et al.*. Towards the PCR-based identification of palearctic *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): results from an international ring trial targeting for species in the subgenus *Avaritia*. *Parasites & Vectors*, 7 (233): 1-9. 2014.
33. Gibbs, E.P.J. & Greiner, E.C., The epidemiology of bluetongue. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 17, 207-220. 1994.
34. Golczer, G. & Arrivillaga, J. Modification of a standard protocol for DNA extraction from smaller sandflies (Phlebotominae: *Lutzomyia*). *Revista Colombiana de Entomología*, 34: 199-202. 2008.
35. Gomulski, L., Meiswinkel, R., Delecolle, J.-C., Goffredo, M., & Gasperi, G., Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera, Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Systematic Entomology*, 30, 619-631. 2005.
36. Gomulski, L., Meiswinkel, R., Delecolle, J., Goffredo, M., & Gasperi, G., Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Medical and Veterinary Entomology*, 30, 229-238. 2006.
37. Gonzalez, M., Alarcón-Elbal, P.M., Valle-Mora, Javier & Goldarazena, A., Comparison of different light sources for trapping *Culicoides* biting midges, mosquitoes and other dipterans. *Veterinary Parasitology*, 226: 44-49. 2016.
38. Gorch, C., Vagnozzi, A., Duffy, S., Miquet, J., Pacheco, J., Bolondi, A., Draghi, G., Cetra, B., Soni, C., Ronderos, M., *et al.*, Bluetongue: isolation and characterization of the virus and vector identification in the northeast of Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 34, 150-156. 2002.

39. Gould, I.T., Perner, M.S., Santini, M.S., Saavedra, S.B., Bezzi, G., Maglianese, M.I., Animan, J.G., Gutiérrez, J.A. & Salomón, O.D., Leishmaniasis visceral en la Argentina: notificación y situación vectorial (2006-2012). *Medicina (B Aires)*, 73: 104-110. 2013.
40. Gran Atlas de Misiones. Instituto Provincial de Estadística y Censos (IPEC). 2012. Available from: <https://ipecmisiones.org/> (verified May 2016).
41. Greiner, E.C., Garris, G.I., Rollo, R.T., Knausenberger, W.I., Jones, J.E. & Gibbs, E.P.J., Preliminary studies on the *Culicoides* spp. as potential vectors of bluetongue in the Caribbean Region. *Preventive Veterinary Medicine*, 2: 389-399. 1984.
42. Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N. & Hickey, D.A., DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, 23 (4): 167-172. 2007.
43. Hall, T. A., BioEdit: a user- friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98. 1999.
44. Harrison, R., Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Tree* 4: 6-11. 1994.
45. Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball & De Waard, J.R., Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 270, 313–21. 2003.
46. Holmes, I.H., Boccardo, G., Estes, M.K., Furuichi, M.K., Family Reoviridae, in: Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A. (Eds.), *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses.* Springer, Wien, New York, Arch. Virol. Suppl. 10: 208–239. 1995.
47. Integrated DNA Technologies, INC., OLIGOANALYZER 3.1. [Online]. Available from: <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer> (verified Dec 2017).
48. Jenkins, A. & Young, M., Breeding sites of *Culicoides* midges in KwaZulu-Natal. *South African Journal of Animal Science*, 40: 510-513. 2010.

49. Kampen, H., Sternberg, A., Proft, J., Bastian, S., Schaffner, F., Maier, W. & Seitz, H.M. Polymerase Chain Reaction–Based differentiation of the mosquito sibling species *Anopheles claviger* s.s. and *Anopheles petragani* (Diptera: Culicidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69(2): 195-199. 2003.
50. Kiehl, E., Walldorf, V., Klimpel, S., Al-Quraishy, S., & Mehlhorn, H., The European vectors of Bluetongue virus: are there species complexes, single species or races in *Culicoides obsoletus* and *C. pulicaris* detectable by sequencing ITS-1, ITS-2 and 18S-rDNA. *Parasitology Research*, 105, 331–336. 2009.
51. Kimura M., A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111-120. 1980.
52. Kline, D.L. & Greiner, E.C., Observations on larval habitats of suspected *Culicoides* vectors of Bluetongue Virus in Florida. “Bluetongue and Related Orbiviruses”, Alan R. Liss, Inc, 221-227. 1985.
53. Lager, I.A., Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Veterinaria Italiana*, 40 (3): 89-93. 2004a.
54. Lager, I.A., Duffy, S., Miquet, J., Vagnozzi, A., Gorchs, C., Draghi, M., Cetrá, B., Soni, C., Hamblin, C., *et al.* Incidence and isolation of bluetongue virus infection in cattle of the Santo Tomé Department, Corrientes Province, Argentina. *Veterinaria Italiana*, 40 (3): 141-144. 2004b.
55. Lane N. On the origin of barcodes. *Nature*, 462:272–27. 2009.
56. Lanteri, A., Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 66 (3-4): 15-25. 2007.
57. Lassen, S. B., Nielsen, S. A., Skovgård, H. & Kristensen, M., Molecular differentiation identification of bloodmeals from biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides* Latreille) in Denmark. *Parasitology Research*, 108: 823-829. 2011.

58. Legisa, D., Gonzalez, F., De Stefano, G., Pereda, A. & Dus Santos, M.J., Phylogenetic analysis of bluetongue virus serotype 4 field isolates from Argentina. *Journal of General Virology*, 94: 652–662. 2013.
59. Li, G., Hu, Y., Kanu, S. & Zhu, X., PCR amplification and sequencing of ITS1 rDNA of *Culicoides arakawae*. *Veterinary Parasitology*, 112: 101–108. 2003.
60. Linton, Y.M., Harbach, R.E., Mohseng, C.; Anthony, T.G. & Matusop, A., Morphological and molecular identity of *Anopheles (Cellia) sunndaicus* (Diptera: Culicidae), the nominotypical member of a malaria vector species complex in Southeast Asia. *Systematic Entomology*, 26: 357-366. 2001.
61. Lucientes, J., C. Calvete, R. Estrada, M. A. Miranda, R. Del Rio, & D. Borrás, Los vectores de la Lengua Azul: conocimientos básicos de su bioecología. El Programa Nacional de Vigilancia Entomológica de la Lengua Azul en España. XXXIII Jornadas Científicas y XII Internacionales de la Sociedad española de Ovidotecnia y Caprinotecnia: 40–51, 2008.
62. MacLachlan, J. N., Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. *Veterinaria Italiana*, 40 (4): 462-467. 2004.
63. MacLachlan, J.N., Bluetongue: history, global epidemiology, and pathogenesis. *Preventive Veterinary Medicine*, 102 (2): 107-111. 2011.
64. Manual de procedimientos Lengua Azul. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Dirección de Luchas Sanitarias. Dirección Nacional de Sanidad Animal. 2004.
65. Marino, P.I., Cazorla, C.G. & Ronderos, M.M., Study of the immature stages of two species of the biting midge genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, 53(2): 777- 792. 2013.
66. Martinez Crovetto, R., Esquema fitogeográfico de la provincia de Misiones. Bomplandia. *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional del Nordeste*. Escuela de Agronomía. Corrientes, 1(3): 171-223. 1963.
67. Meiswinkel, R. & Elbers, A.R., The dying of the light: crepuscular activity in *Culicoides* and impact on light trap efficacy at temperate latitudes. *Medical and Veterinary Entomology*, 30: 53-63. 2016.

68. Mercer, D.R., Spinelli, G.R., Watts, D. & Tesh, R., Biting rates developmental substrates for biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Iquitos Perú. *Journal of Medical Entomology*, 40 (6): 807-812. 2003.
69. Mellor, P.S.; Boorman, J. & Baylis, M., *Culicoides* Biting Midges: Their role as Arbovirus vectors. *Annual Review Entomology*, 45:307-340. 2000.
70. Mourão, M., Bastos, M., Gimaque, J., Mota, B., Souza, G., Grimmer, G., Galusso, E., Arruda, E., Figueiredo, L., Oropouche Fever Outbreak, Manaus, Brazil, 2007-2008. *Emerging Infectious Diseases*, 15(12):2064. 2009.
71. National Center for Biotechnology Information [Online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (verified 1 Jul. 2018).
72. National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment Tool [Online]. Available from: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (verified 3 March 2018).
73. Navarro, D., Rivera, H., Caceres, A. & Rondón, J., Identificación morfológica de *Culicoides* spp. Descritos como transmisores de Orbovirus capturados en granjas de avinos en Pucallpa, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 29 (1): 302-309. 2018.
74. Nodarse, J.F; Rodriguez, J.; Fuentes, O.; Castex, M. & Fernandez-Caliènes, A. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatómíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 56(3): 208-13. 2004.
75. Noriega, J.A.; Santos, A.M.C; Aranda, S.C.; Calatayud, J.; Castro, I.; Espinoza, V.R.; Hórreo, J.L.; Medina, N.G.; Pelaéz, M.L. & Hortal, J., ¿Cuál es el alcance de la crisis de la Taxonomía? Conflictos, retos y estrategias para la construcción de una Taxonomía renovada. *Revista Ibero Diversidad Entomológica*, 9: 1-16. 2015.
76. OIE- Organización Mundial de Sanidad Animal. Available from: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/el-sistema-mundial-de-informacion-sanitaria/antigua-clasificacion-de-enfermedades-de-declaracion-obligatoria-a-la-oie-lista-a> (verified 4 Feb 2016).

77. Pagés, N., Muñoz-Muñoz, F., Talavera, S., Sarto, V., Lorca, C. & Núñez, J.I., Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the Subgenus *Culicoides* and development of species- specific PCR assays based on barcode regions. *Veterinary Parasitology*, 165: 298-310. 2009.
78. PAHO. Alerta epidemiológica: Brote de fiebre de Oropouche. 2010. Organización Panamericana de la Salud. Available from: http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/2010/alerta_epi_2010_22_junio_Fiebre_Oropouche.pdf (verified Jul 2017).
79. Perrin, A., Cetre-Sossah, C., Mathieu, B., Baldet, T., Delecolle, J., & Albina, E., Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. *Medical and Veterinary Entomology*, 20, 219-228. 2006.
80. Perruolo, G.J., Clave de las especies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) asociadas con la ganadería en la Región Neotropical. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 19(2): 124 - 133. 2009.
81. Portela Lobato, Z. I. , Maldonado Coelho Gudes, M.I. & Diniz Matos, A.C., Bluetongue and other arboviruses in South America: gaps and challenges. *Veterinaria Italiana*, 51 (4): 253-262. 2015.
82. Probst, C., Gethmann, C., Kampen, H., Werner, D. & Conraths, F.J., A comparison of four light traps for collecting *Culicoides* biting midges. *Parasitology Research*, 114: 4717-4724. 2015.
83. Rantakokko-Jalava, K. & Jalava, J. Optimal DNA Isolation Method for Detection of Bacteria in Clinical Specimens by Broad-Range PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 40(11): 4211-17. 2002.
84. Rebêlo, J.M., Rodrigues, B.L., Bandeira, M.D., Moraes, J.L., Fonteles, R.S., Pereira, S.R. Detection of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* in *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in the Brazilian Amazonia. *Journal of Vector Ecology*, 41(2):303-308. 2016.
85. Ronderos, M.M., Spinelli, G.R. & Sarmiento, P., Preparation and mounting of biting midges of the genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) to be observed with Scanning Electron Microscope. *Transactions of the American Entomological Society*, 126(1): 125-132. 2000.

86. Ronderos M.M. & Diaz, F., Rearing *Culicoides bambusicola* (Lutz, 1913) (Diptera, Ceratopogonidae) in laboratory. Observations and new records. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural del Paraguay*, 14 (1-2): 43 – 48. 2002.
87. Ronderos, M. M.; Spinelli, G. R.; Lager, I. & Díaz, F., La importancia sanitaria de los jevenes del Género *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) en la Argentina. Universidade Gama Filho. *Entomología y Vectores* 10 (4): 601-612. 2003a.
88. Ronderos, M.M., Greco, N.M. & Spinelli, G.R., Diversity of Biting Midges of the Genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) in the Area of the Yacretá Dam Lake. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(1): 19-24. 2003b.
89. Ronderos M.M., Diaz, F. & Sarmiento, P., A new method using acid to clean and a technique for preparation of eggs of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) for Scanning Electron Microscope. *Transactions of the American Entomological Society*, 134(3+ 4): 471-476. 2008a.
90. Ronderos, M.M., Spinelli, R.G. & Borkent, A., A descripción of the larva and pupa of *Culicoides charruus* Spinelli & Martinez (Diptera: Ceratopogonidae) from leaf axils of *Eryngium pandanifolium* (Apiaceae) in Argentina. *Russian Entomological Journal*, 17(1): 115-122. 2008b.
91. Ronderos, M.M., Cazorla, C. G. & Spinelli, G. R., The immature stages of the biting midge *Culicoides debilipalpis* Lutz (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa*, 2716: 42-52. 2010.
92. Rosero, D.A., Gutierrez, L.A., Cienfuegos, A.V., Jaramillos L.M & Correa,M., Optimization of a DNA extraction procedure for anopheline mosquitoes. *Revista Colombiana de Entomología*, 36(2): 260-263. 2010.
93. Saitou N. & Nei M., The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425. 1987.
94. Salomón, O.D., Mastrángelo, A.V., Santini, M.S., Liotta, D.J. & Yadón, Z.E., La ecoepidemiología retrospectiva como herramienta para la vigilancia de leishmaniasis en Misiones, Argentina, 1920-2014. *Revista Panamericana de Salud Publica*, 40(1): 29-39. 2016.

95. Santamaría, E., Ponce, N.B., Puerta, C. & Ferro, C. Validación de la PCR en la detección de parásitos de *Leishmania* (Viannia) spp. en *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae), como herramienta en la definición de especies vectoras. *Biomédica*, 25:271-9. 2005.
96. Santamaría, E., Cabrera, O.L., Zipa, Y., Ferro, C., Ahumada, M.L. & Pardo, R.H., Diagnóstico preliminar de la molestia sanitaria causada por Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) en el Departamento de Boyacá, Colombia. *Biomédica*, 28 (004) 1-33. 2008.
97. Santiago-Alarcon, D., Havelka, P., Schaefer, H., Segelbacher, G., Bloodmeal analysis reveals avian *Plasmodium* infections and broad host preferences of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vectors. *PLoS One*, 7(2):e31098. 2012.
98. Seblova, V., Sadlova, J., Carpenter, S. & Petr Volf, P., Speculations on biting midges and other bloodsucking arthropods as alternative vectors of *Leishmania*. *Parasites & Vectors*, 7:222. 2014.
99. Shelley, A.J. & Coscaron, S., Simuliid blackflies (Diptera: Simuliidae) and ceratopogonid midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Onchocercidae) in northern Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96:451-458. 2001.
100. Sherlock, I. & Guitton, N.G., I. Entomological survey. Dermatozoonosis by *Culicoides* bite (Diptera: Ceratopogonidae) in Salvador, State of Bahia, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 62, 56-65. 1964.
101. Silva, F.D.F., Okada, Y. & Felipe-Bauer, M.L., *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) da vila de Alter do Chão, Santarém, Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazonica de Saúde*, 1 (3):69-74. 2010.
102. Slama, D., Chaker, E., Mathieu, B., Babba, H., Depaquit, J., & Augot, D., Biting midges monitoring (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides* Latreille) in the governate of Monastir (Tunisia): species composition and molecular investigations. *Parasitology research*, 113(7), 2435-2443. 2014.
103. Slama, D., Haouas, N., Remadi, L., Mezhoud, H., Hamouda Babba, H. & Chaker, E., First detection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasites & Vectors*, 7:51. 2014.

104. Spinelli, G.R. & Ronderos, M.M., Ceratopogonidae (Formas hematófagas). Publicación Mundo Sano. Artrópodos de interés médico en Argentina. Serie Enfermedades Transmisibles, 6:61-66. 2005.
105. Spinelli, G.R., Ronderos, M.M., Díaz, F. & Marino, P., The bloodsucking biting midges of Argentina (Diptera: Ceratopogonidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Vol. 100: 137-150. 2005.
106. Stefañuk, M.A., Diccionario Geográfico Toponímico de Misiones. Contratiempo Ediciones, 1-817. 2009.
107. Stephan, A., Clausen, P.-H., Bauer, B. & Steuber, S., PCR identification of *Culicoides dewulfi* midges (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of bluetongue in Germany. *Parasitology Research*, 105:367-371. 2009.
108. Stur, E. & Borkent, A., When DNA barcoding and morphology mesh: Ceratopogonidae diversity in Finnmark, Norway. *ZooKeys*, 463: 95–131. 2014.
109. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, (28): 2731-39. 2011.
110. Tanya, V.N., Greiner, E.C., & Gibbs, E.P.J., Evaluation of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus. *Veterinary microbiology*, 32(1): 1-14. 1992.
111. Uslu, U. & Dik, B., Vertical distribution of *Culicoides* larvae and pupae. *Medical and Veterinary Entomology*, 20: 350-352. 2006.
112. Uslu, U. & Dik, B., Description of breeding sites of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in Turkey. *Parasite*, 14: 173-177. 2007.
113. Veggiani Aybar, C.A.; Dantur, Juri M.J.; Lizarralde de Grosso, M.S.; Spinelli, G.R., Spatial and temporal distribution of *Culicoides insignis* and *Culicoides paraensis* in the Subtropical Mountain Forest of Tucumán, Northwestern Argentina. *Florida Entomologist*, 94(4): 1018-1025. 2011.
114. Venter, J.L., Labuschagne, K., Hermanides, K.G., Boikanyo, S.N.B., Majatladi, D.M. & Morey, L., Comparison of the efficiency of five suction light traps under field conditions in South Africa for the collection of *Culicoides* species. *Veterinary Parasitology*, 166: 299–307. 2009.

115. Venter, J.L., Boikanyo, S.N.B., Majatladi, D.M. & Morey, L., Influence of carbon dioxide on numbers of *Culicoides* midges collected with suction light traps in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology*, 30(1):117-122. 2015.
116. Vitale, G. C., Wirth, W. W. & Aitken, T. H. G., New species and records of *Culicoides* reared from arboreal habitats in Panamá, with a synopsis of the *debilipalpis* group (Diptera: Ceratopogonidae). *Proceedings of Entomological Society of Washington*, 83: 140-159. 1981.
117. Williams, R. W. , Observations on habitats of *Culicoides* larvae in Trinidad (Diptera: Ceratopogonidae). *Annals Entomological Society of America*, 57: 462-466. 1964.
118. Wirth, W.W., Dyce, A.L. & Spinelli, G.R., An atlas of wing photographs, with a summary of the numerical characters of the Neotropical species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Contributions of the American Entomological Institute*, 25: 1-72. 1988.
119. Wirth, W.W. & Blanton, E.S., Biting midges of the genus *Culicoides* from Panama (Diptera: Heleidae). *Proceedings of the United States National Museum*, 109: 237-482. 1989.