



Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales. Departamento de Genética

Tesista

Mahia Mariel Ayala

Caracterización ecológica y molecular de *Culicoides insignis* Lutz (Díptera: Ceratopogonidae)

Tesis presentada para obtener el título de
“Licenciada en Genética”

Director

Msc. Leonardo Horacio Walantus

Co-Director

Dr. Pedro Darío Zapata

Asesora

Lic. Yanina Martos Schott

Posadas, Misiones 2011



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



TESINA PARA OPTAR POR EL TITULO DE LICENCIADA EN GENETICA

Título: Caracterización ecológica y molecular de
Culicoides insignis Lutz
(Díptera: Ceratopogonidae)

Alumna: Ayala, Mahia Mariel.

Director: Msc. Walantus, Leonardo Horacio.

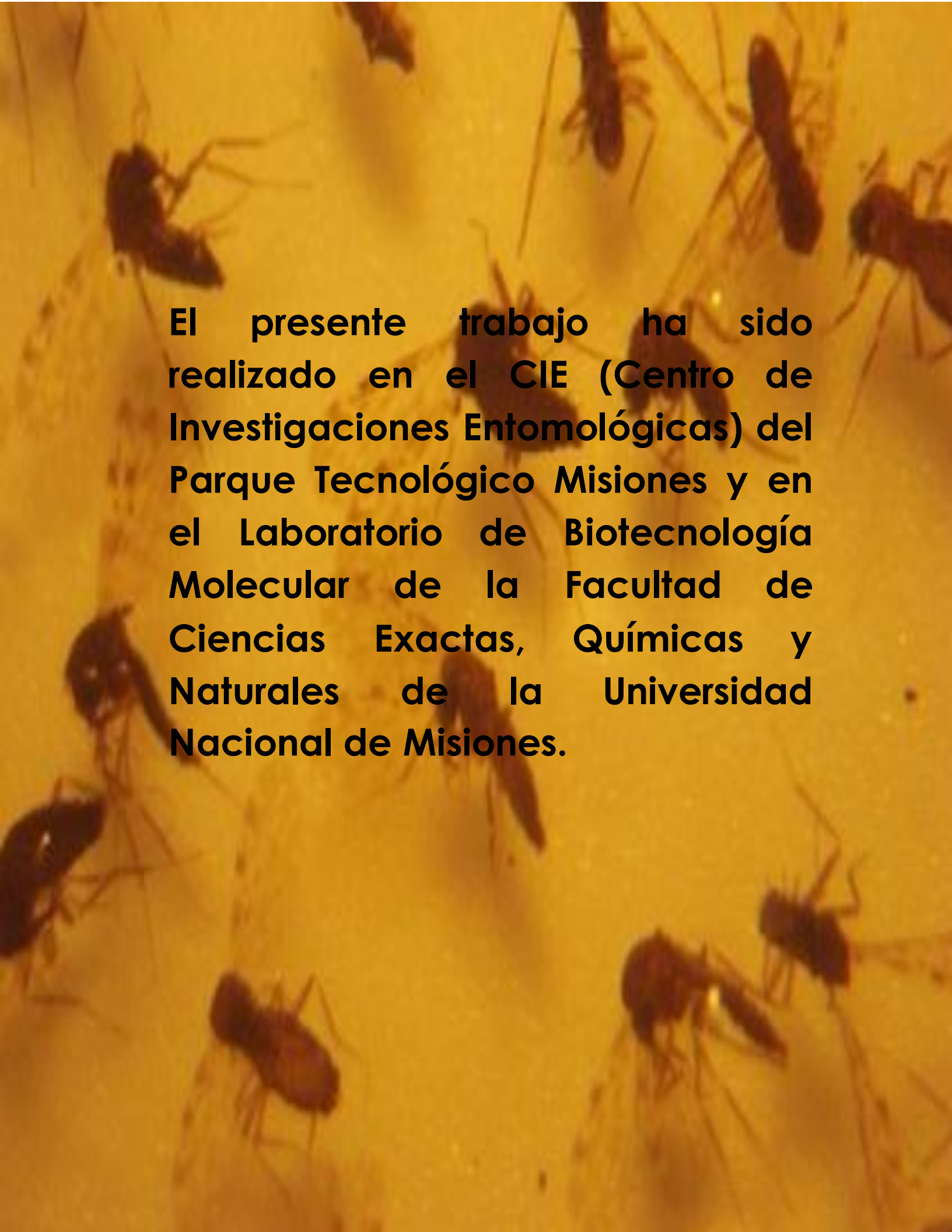
Co-Director: Dr. Zapata, Pedro Darío.

Asesora: Lic. Martos Schott, Yanina.

CIE
Centro de Investigaciones
Entomológicas

Posadas, Misiones
2011



The background of the slide is a close-up photograph of several ants on a yellow, textured surface. The ants are dark brown or black, and their legs and antennae are clearly visible. They are scattered across the frame, with some in the foreground and others in the background, creating a sense of movement and activity.

El presente trabajo ha sido realizado en el CIE (Centro de Investigaciones Entomológicas) del Parque Tecnológico Misiones y en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones.

The background of the image is a close-up photograph of numerous ants on a light-colored, textured surface. The ants are scattered across the frame, with some in sharp focus and others blurred. The lighting is warm and yellowish, creating a soft, intimate atmosphere. The ants appear to be of various species, including some with wings.

Dedicatoria:

**A mi mamá por su apoyo
incondicional.**

AGRADECIMIENTOS:

- A Dios y la Virgen María.
- A mi Director Msc. Leonardo Horacio Walantus.
- A mi Co-Director Dr. Pedro Darío Zapata.
- A mi Asesora la Lic. Yanina Martos.
- Al Dr Gustavo Spinelli; el Prof. Gustavo Rossi; el Dr. Pablo Marino, y la Dra. Marcela Ronderos del Departamento Científico de Entomología del Museo de La Plata.
- Al Dr. Ellis Greiner de la Universidad de Florida (EEUU) por enviarme trabajos de su autoría.
- A todos los integrantes del CIE y del Laboratorio de Biotecnología Molecular.
- A mi familia, mis amigos y todos los seres queridos que estuvieron cerca siempre y que confiaron en mí desde el primer momento.

MUCHAS GRACIAS!!



INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

REFERENCIAS	PAGINAS
FIGURA 1 - Ciclo de vida de insectos de la Familia Ceratopogonidae	5
FIGURA 2 - Larva de <i>Culicoides sp.</i>	8
FIGURA 3 - Pupa de <i>Culicoides sp.</i>	9
FIGURA 4 - Adulto de <i>Culicoides sp.</i>	10
FIGURA 5 - Ala de una hembra de <i>Culicoides sp.</i> , señalando celdas y venas	11
FIGURA 6 - Ala de <i>Culicoides insignis</i> señalando celdas y venas	16
FIGURA 7 - Localización y organización de ADN ribosómico	19
FIGURA 8 - Imagen satelital Google Earth de la zona de afectación de la Represa Yacyretá sobre el Arroyo Zaimán	23
TABLA I - Coordenadas GPS del punto de muestreo de adultos	22
TABLA II - Coordenadas GPS puntos de muestreo de larvas	22
FIGURA 9 - Curvas de nivel	24
FIGURA 10 - Trampa CDC para colecta de adultos	25
FIGURA 11 - Puntos de muestreo de larvas de Ceratopogonidae sobre el A°Zaimán	27
TABLA III - Detalle de reactivos agregados al Buffer de Lisis en tubos	29



TABLA IV - Detalle de cebadores PanCul-F y PanCul-R Eurofins MWG Operon incluyendo secuencia, cantidad de CG y Th	30
FIGURA 12 - Ejemplar de <i>Culicoides insignis</i> colectado en trampa de luz	32
TABLA V - Condiciones ambientales correspondientes al lugar de colocación de trampa de luz	33
FIGURA 13 - Trampa para estadíos inmaduros colocada en el CIE	34
TABLA VI - Número total de larvas encontradas en los puntos de trabajo	34
TABLA VII - Condiciones ambientales correspondientes a los sitios de muestreo de larvas	35
FIGURA 14 - Larva de Ceratopogonidae del Género <i>Alluaudomyia</i>	36
FIGURA 15 - ADN genómico total extraído de adultos de <i>C. insignis</i>	38
FIGURA 16 - Amplificación de ITS-1 de <i>Culicoides spp.</i> por PCR con PanCul-F y PanCul-R	39
FIGURA 17 - Amplificación de ITS-1 de <i>Culicoides insignis</i> por PCR con PanCul-F y PanCul-R	40



RESUMEN

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.

El género *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) es particularmente importante desde el punto de vista sanitario, y es el numéricamente mejor representado. La identificación morfológica de los *Culicoides* suele resultar muy tediosa además de consumir mucho tiempo debido principalmente al pequeño tamaño de los ejemplares adultos, que oscilan entre 1.5 a 3 mm. El desarrollo de un método basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando primers específicos para este Género ofrece una posibilidad de simplificar el proceso de identificación de los *Culicoides*.

Las especies hematófagas son eficientes vectores de enfermedades, como el Virus de la Lengua Azul (BTV) que ataca principalmente al ganado ovino y rumiantes silvestres y de cría causando pérdidas económicas importantes y serios daños en el animal incluso la muerte. En la Región Neotropical *Culicoides insignis* Lutz, una de las especies más abundantes en nuestra zona, es considerado el principal vector potencial de este virus.

En este trabajo se caracterizaron posibles criaderos de especies de *Culicoides*, se estandarizó un protocolo de extracción de ADN para este grupo, y se optimizaron las condiciones de PCR utilizando primers específicos para este género, los cuales amplifican las regiones altamente conservadas del ITS1 en el ADN nuclear.



ABSTRACT

Ceratopogonidae biting midges are a small and highly diverse worldwide family. Some of its species are known as pests to humans and animals. However, their ecology is poorly understood mainly because of their remarkable diversity, both in number of species and in the adaptations they present.

The Genus *Culicoides* Latreille have public health importance and is numerically the best represented. Morphological identification of biting midges can be tedious and time-consuming because of their size ranging from 1.5 to 3 mm. A method based on the polymerase chain reaction (PCR) using genus-specific primers offers the opportunity of simplifying the identification process of *Culicoides* midges.

Bloodsucking midges are also efficient vectors of diseases as Bluetongue Virus (BTV) in wild and domestic ruminants. In the Neotropical Region *Culicoides insignis* Lutz, one of the most abundant species in our area, is the principal potential vector of this virus.

In this work, potential breeding sites for *Culicoides* biting midges were characterized, protocols for the extraction of ADN were standardized and conditions for PCR were optimized with genus-specific primers which enlarge the highly conserved ITS-1 regions in the nuclear ADNr.



INTRODUCCION

Familia Ceratopogonidae

La Familia Ceratopogonidae comprende un grupo muy diverso de dípteros nematóceros de pequeño tamaño y de distribución cosmopolita. Esta familia se divide en cuatro subfamilias bien establecidas, basadas en relaciones cladísticas: Leptoconopinae (2 géneros), Forcipomyiinae (2 géneros) Dasyheleinae (1 género) y Ceratopogoninae (105 géneros). La subfamilia Ceratopogoninae es dividida en 6 tribus: Culcoidini (3 géneros), Ceratopogonini (58 géneros), Heteromyiini (8 géneros), Sphaeromiini (28 géneros), Palpomyiini (6 géneros) y Stenoxenini (2 géneros) (Borkent & Spinelli, 2007).

Todos los miembros de la familia Ceratopogonidae son holometábolos (Lucientes *et al.*, 2008), tienen un ciclo de vida que consiste en un estado de huevo, cuatro estadios larvales, un estadio pupal y el estado adulto (Figura 1).

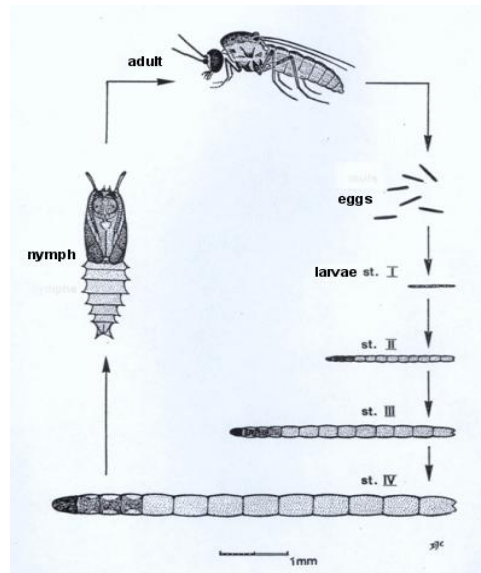


Figura 1. Ciclo de vida de insectos de la Flia. Ceratopogonidae.



El hecho de que los ceratopogónidos adultos, como grupo, se presenten durante todo el año en áreas tropicales sugiere que varias especies tienen ciclos de vida múltiples, sin que el tercer o cuarto estadio larval experimente una diapausa, como ocurre en especies presentes en las regiones frías. En condiciones óptimas, con temperaturas entre 28° y 35°C, la emergencia del adulto ocurre en un período de 15 días, pero el ciclo puede variar desde 7 días en los trópicos hasta 7 meses pasando el invierno en estado de diapausa (Borkent & Spinelli, 2007).

Los lugares donde realizan la puesta de huevos y se desarrollan las larvas varían mucho de una especie a otra. En general, los huevos son colocados en substratos húmedos, con abundante materia orgánica que sirve de nutrientes a las bacterias, algas o nematodos de vida libre que son la base de su alimentación. Los huevos no son resistentes a la desecación y son colocados preferentemente aislados en el ambiente acuático o semi-acuático (Borkent & Spinelli, 2007).

Las larvas de Ceratopogonidae son detritívoras y depredadoras en los ambientes acuáticos y semi-acuáticos de todos los tamaños, desde pequeños huecos de árboles hasta grandes lagos y ríos (Borkent & Spinelli, 2007).

Los estados inmaduros de las cuatro Subfamilias difieren substancialmente entre sí. Las larvas de la subfamilia Ceratopogoninae, que constituyen el grupo con mayor número de especies, son prognatas y carecen de ganchos. Estas larvas se desplazan con un movimiento rápido y ondulante característico, se alimentan de microorganismos, invertebrados de pequeño tamaño, en su mayoría larvas de otros insectos, razón por la cual en muchos hábitats ejercen un importante papel como controladores biológicos. Por otro lado, en algunos ríos, estos estados inmaduros constituyen una fuente esencial de alimento para otros invertebrados y peces (Borkent & Spinelli, 2007).



Las pupas de Ceratopogonidae son generalmente lentas, éstas se desplazan moviendo su abdomen de manera más o menos circular hasta que encuentran una apropiada posición de reposo en medio del substrato o de la superficie del agua donde ubican sus órganos respiratorios, localizados anteriormente en el cefalotórax, y así obtienen aire (Borkent & Spinelli, 2007) .

Las hembras adultas requieren de una alimentación con sangre para desarrollar los huevos (Mullen & Durden, 2002). Algunas son hematófagas de vertebrados, o actúan como ectoparásitos de insectos grandes. Otras en cambio, son predadoras y se alimentan de otros insectos voladores, que suelen tener un tamaño similar al de ellas mismas, en este caso inyectan a sus presas enzimas proteolíticas que disuelven los órganos internos y tejidos, luego succionan éstos líquidos, ricos en proteínas y lípidos, que le sirven de alimento (Borkent & Spinelli, 2007).

Ciertas hembras son picadoras diurnas (como ocurre en los géneros *Leptoconops*, *Forcipomyia* (Lasiohelea) y en pocas especies de *Culicoides*), mientras que la mayoría de las especies de *Culicoides* son picadores crepusculares o nocturnos. 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 (diferentes tipos de insectos, por succión de la hemolinfa de las nervaduras alares, o 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., 2003).



Género *Culicoides*

De los 102 géneros vivientes que conforman la familia Ceratopogonidae (Díptera: Nematóceras) mencionados por Borkent y Wirth (1997), las hembras de sólo cuatro de ellos presentan hábitos hematófagos: *Austroconops* Wirth & Lee, *Leptoconops* Skuse, *Forcypomyia* Meigen (solo aquellas especies incluidas en el Subgénero *Lasiohelea* Kieffer) y *Culicoides* Latreille. Este último es particularmente importante desde el punto de vista sanitario, y es el numéricamente mejor representado. En Argentina, sus especies son conocidas vulgarmente como “jejenes”, “polvorines” o “marigui mini” (Ronderos *et al.*, 2003).

Las larvas de especies pertenecientes al Género *Culicoides* (Figura 2) tienen aspecto vermiforme, el cuerpo es blanco translúcido y presentan una cápsula cefálica de color amarillo a marrón (Mullen & Durden, 2002).

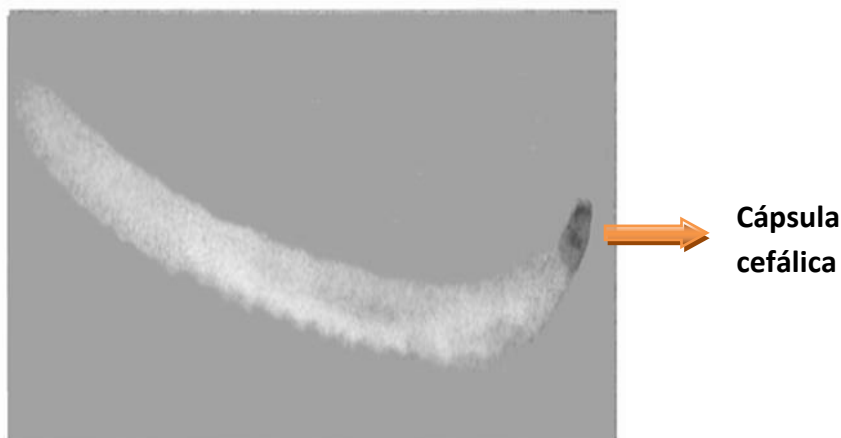


Figura 2. Larva de *Culicoides* sp. (Gentileza Dra. Ronderos María).

El aparato bucal está compuesto por un par de mandíbulas que no son opuestas, éstas se mueven en forma vertical y rotan parcialmente mientras la larva se alimenta; localizada en la cavidad bucal se encuentra una estructura compleja denominada epifaringe, la cual se mueve hacia adelante y hacia atrás



desmenuzando así las partículas de alimento, y participa también en el movimiento del mismo hacia el tracto alimentario. Tienen tres segmentos torácicos y nueve segmentos abdominales, todos ellos parecidos en tamaño, lo que contribuye con la apariencia alargada y cilíndrica de las larvas (Mullen & Durden, 2002). Se encuentran en materia orgánica en descomposición, estiércol, frutos, epífitas, huecos de árboles, barro húmedo y en una gran variedad de otros hábitats acuáticos (Borkent & Spinelli, 2007). 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).

Las pupas (Figura 3) presentan una coloración marrón, su cuerpo está dividido en cefalotórax y abdomen, con órganos respiratorios indivisos y con una serie de pequeños espiráculos (Spinelli & Ronderos, 2005).

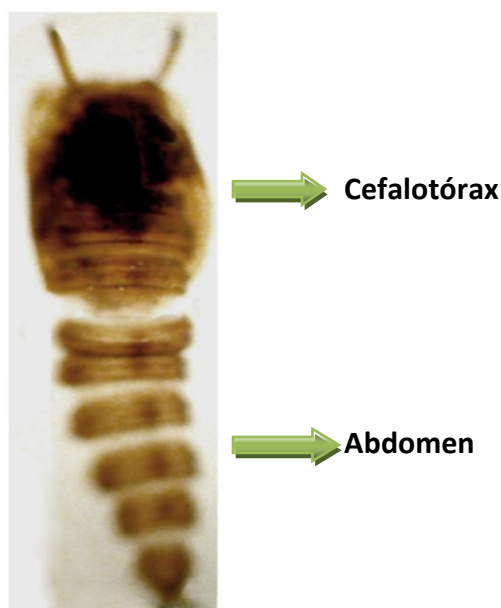


Figura 3. Pupa de *Culicoides* sp. (Gentileza Dra. Ronderos María).



Los *Culicoides* adultos (Figura 4) se caracterizan por su pequeño tamaño (miden 1.5 a 3 mm de longitud), tienen el cuerpo delgado a moderadamente robusto. 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).



Figura 4. Adulto hembra de *Culicoides* sp.

Tienen las patas muy cortas y como pliegan las alas sobre el dorso cuando se posan sobre la piel de los animales para picar, pasan prácticamente desapercibidos. Las alas están superpuestas sobre el dorso en individuos vivos en reposo; es muy particular de éste género la morfología de las alas que disponen de venas y celdas características; también suelen presentar manchas cuya forma y disposición son útiles para clasificarlos a nivel de especie (Lucientes *et al.*, 2008).



Las alas de este género (Figura 5) se caracterizan por la presencia de una vena transversal radio-mediana (r-m), celdas radiales bien desarrolladas, la segunda celda radial sobrepasa la mitad del ala, la vena anterior M está bifurcada, y la vena cubital CuA se encuentra también bifurcada en la mitad del ala o más (Perruolo, 2009).

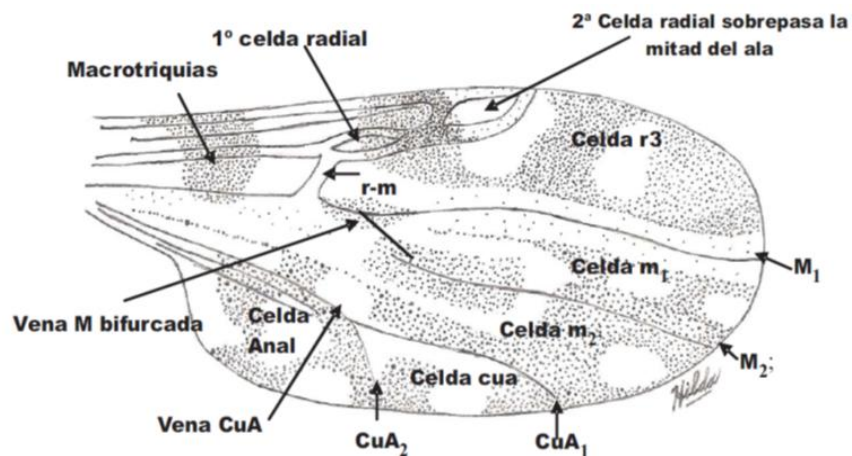


Figura 5. Ala de una hembra de *Culicoides sp.*, señalando las celdas y venas (Perruolo, 2009).

El abdomen posee 10 segmentos al final de los cuales la hembra tiene 2 prolongaciones cortas redondeadas denominadas cercos abdominales; 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 presentan las partes bucales reducidas, en cambio las hembras son hematófagas; éstas presentan mandíbulas serradas, que constituyen el aparato bucal picador de tipo cortador chupador, compuesto de varios estiletes con los que hacen pequeños cortes en la piel donde se acumula la sangre que después chupan con su trompa (Mullen & Durden, 2002). Habitualmente son oportunistas y suelen picar a las aves, reptiles y a mamíferos,



incluso al hombre. La realidad es que dependiendo del lugar donde se crían ingieren sangre de las especies más abundantes (Lucientes *et al.*, 2008). Ambos sexos necesitan alimentarse de azúcares para sobrevivir y para mantener su actividad, estos azúcares los obtienen a partir de plantas, de flores y de excreciones de áfidos (Spinelli & Ronderos, 2005).

Los *Culicoides* normalmente suelen empezar a volar cuando se pone el sol, aprovechando que disminuye la temperatura y aumenta la humedad del ambiente (Lucientes *et al.*, 2008). En condiciones normales los adultos vuelan como mucho unos pocos centenares de metros, aunque hay evidencias de que los polvorines son transportados con el viento por largas distancias (Lucientes *et al.*, 2008; Sellers, 1981).

Importancia Sanitaria en la Argentina

- **Picaduras y alergias**

Es conocido el prurito y las eventuales reacciones alérgicas que provocan las picaduras de los polvorines (Ronderos *et al.*, 2003). Dependiendo del grado de sensibilidad de las personas a los componentes de la saliva de éstos insectos, las picaduras pueden causar reacciones inmediatas o tardías que van desde dermatitis alérgicas, pápulas y pústulas producto de la infección por rascado, hasta reacciones más severas como los eczemas dérmicos, descamación y cicatrices con alteración en la pigmentación de la piel (Sherlock & Guitton, 1965).

Se han constatado cuadros asmáticos típicos en personas sin antecedentes alérgicos, luego de múltiples picaduras producidas por numerosos ejemplares de *Culicoides sp.* en la Argentina (Ronderos *et al.*, 2003).



Enfermedades transmisibles

Estos pequeños dípteros se hallan involucrados en la transmisión de nemátodos, protozoos y virus (Ronderos *et al.*, 2003).

El rol de vector de los Ceratopogonidae en la Argentina es bien conocido hasta el presente sólo para el caso de *Manzonella ozzardi* (Manson) una filaria parásita del hombre relativamente no patogénica (Holbrook, 1996). Los focos de mansonelosis están restringidos al noroeste del país, particularmente en las provincias de Tucumán y Jujuy. Se determinó que *Culicoides lahillei* (Iches) se comporta como el vector principal, mientras que *Culicoides paraensis* lo hace como vector secundario (Shelley & Coscaron, 2001).

Más allá de del caso de la mansonelosis, la importancia sanitaria de los Ceratopogónidos, en particular de los *Culicoides* en la Argentina es hasta ahora potencial, y se centra en dos problemas principales, en los cuales diferentes virus se comportan como agente causal (Ronderos *et al.*, 2003):

El virus Oropouche (OROV), perteneciente a la familia Bunyaviridae, se halla antigénicamente incluido en el serogrupo Simbú, y es el más importante agente etiológico de una enfermedad humana vehiculizado por una especie de Ceratopogonidae. Se reconocen dos ciclos: el silvestre, en el cual la infección transcurre de modo asintomático en perezosos, aves, primates y roedores, y que es transmitido probablemente por los mosquitos (Culicidae) *Coquillettidia venezuelensis* (Theobald) y *Ochlerotatus serratus* (Theobald), a partir de los cuales fue aislado el virus. El ciclo urbano, por otra parte se manifiesta por epidemias que afectan al hombre, y las poblaciones de *Culicoides paraensis* ostentan una gran densidad durante las epidemias del Oropouche (Hoch *et al.*, 1990; Mellor *et al.*, 2000). Además, *C. paraensis* resultó ser un vector eficiente en ensayos experimentales de transmisión a hámsters, y el hombre desarrolla una viremia de suficiente nivel como para infectar a los *Culicoides* y, a su vez, éstos



pueden retransmitir el virus al hámster; por lo tanto *C. paraensis* es el mayor vector biológico del OROV al hombre durante el transcurso de las epidemias urbanas (Pinheiro *et al.*, 1981).

La sintomatología de la enfermedad es similar a la del dengue clásico, con una duración aproximada de una semana y generalmente no es fatal (Leduc *et al.*, 1981).

En cuanto al rol en medicina veterinaria la importancia principal radica en los problemas ocasionados por el virus de la lengua azul (“bluetongue”: BTV). Este virus es perteneciente a la familia Reoviridae, y Género Orbivirus, cuya característica más relevante es la doble cadena de ARN dividido en 10 a 12 segmentos independientes, tratándose de virus desnudos que se replican en el citoplasma (Urbano & Urbano, 1994). Hasta el momento se conocen 24 serotipos distintos, y algunos autores recomiendan tratarlos como si fueran en realidad 24 enfermedades diferentes puesto que los síntomas, lesiones, la morbilidad y mortalidad varían mucho de un serotipo a otro. Todos estos serotipos son transmitidos por *Culicoides sp.*, y aunque se conocen más de 1.400 especies de *Culicoides* distribuidas por todo el mundo, casi todas hematófagas, solo 32 de ellas están implicadas directamente en la transmisión de la Lengua Azul, y es posible que no todas puedan transmitir los 24 serotipos diferentes (Lucientes *et al.*, 2008).

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 (Lucientes *et al.*, 2008).



La especie del vector varía según la zona geográfica y el serotipo actuante (Gibbs & Greiner, 1994; Maclachlan, 1994), por ejemplo en Europa los principales vectores de BTV son *Culicoides imicola*, *Culicoides dewulfi* y los Complejos *Culicoides pullicaris* y el *Culicoides obsoletus* (Lucientes *et al.*, 2008); mientras que la especie sospechada de comportarse como vector en la Región Neotropical es *Culicoides insignis* Lutz (Wirth & Dyce, 1985; Saenz & Greiner, 1994), cuya clasificación taxonómica es: (ITIS- Integrated Taxonomic Information System)

Reino: Animal

Phillum: Arthropoda

Subphillum: Hexapoda

Clase: Insecta

Subclase: Pterygota

Infraclase: Neoptera

Orden: Diptera

Suborden: Nematocera

Infraorden: Culicomorpha

Familia: Ceratopogonidae

Subfamilia: Ceratopogoninae Newman

Tribu: Culicoidini Kieffer

Género: *Culicoides* Latreille, 1809

Especie: *Culicoides insignis* Lutz, 1913





C. insignis es una de las especies más abundantes en la Argentina (Spinelli, 1992), sus alas (Figura 6) presentan la nervadura r-m oscurecida anteriormente; la nervadura R_3 oscurecida en la porción adyacente al área clara donde la nervadura dobla abruptamente para encontrarse con la costa. La celda m_1 con solo un área clara distal al área clara doble que atraviesa a la nervadura M_2 (Spinelli *et al.*, 2005).

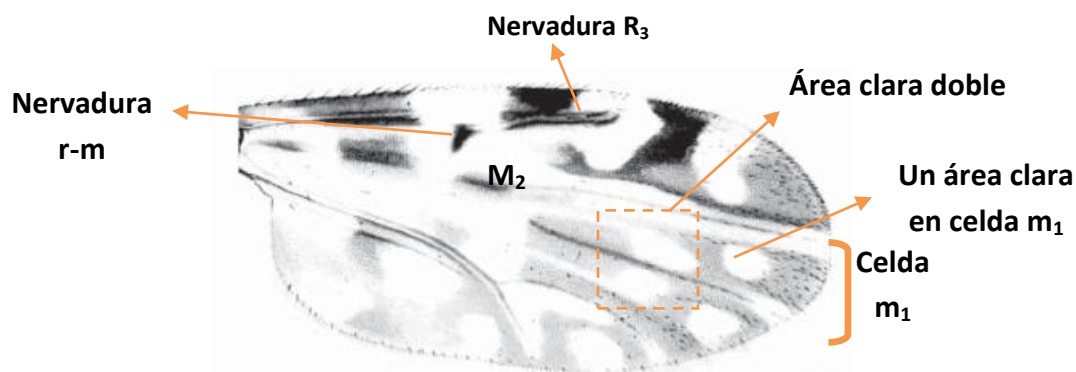


Figura 6. Ala de una hembra de *C. insignis* (Spinelli, 2005).

Esta especie está frecuentemente asociada al ganado vacuno (Spinelli, 1992), y además demostró ser competente para la transmisión del BTV en laboratorio (Tanya *et al.*, 1992).

El BTV es una enfermedad que ataca principalmente al ganado ovino y rumiantes silvestres y de cría, causando serios daños incluso la muerte del animal. Los signos de la enfermedad son muy evidentes en los ovinos y en algunos rumiantes no domésticos (Obdein, 1984), en los primeros 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 toma una coloración azulada, a lo que debe el nombre del 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, llegando a la incapacidad de permanecer parados (Ronderos *et al.*,2003).

También afecta al ganado bovino, en este caso la infección es mucho más común que en ovinos, aunque cursa normalmente sin sintomatología o con síntomas ligeramente perceptibles. Los bovinos que muestran signos de la enfermedad representan menos del 5% de los animales adultos, y estos signos son similares a los señalados para ovinos, aunque es común también la inflamación de los pezones en vacas lecheras (Ronderos *et al.*,2003).

Esta enfermedad, que fue reconocida por primera vez en Sudáfrica a fines del siglo XVIII, y fue descrita en detalle a principios del siglo XIX, se conocía como “Catarró Epizoótico de la Ovejas”, y Spruell (1902), aún sin conocer la etiología, propuso el nombre de “Lengua Azul”. Recién en 1947 se la conoció fuera de África, a través de una epizootia ocurrida en la Isla de Chipre, y posteriormente fue registrada en diferentes sitios del Viejo Mundo (Sur de Europa, India, Pakistán, Medio Oriente) y en América del Norte. En la Región Neotropical, aunque se conoce acerca de la circulación del virus en América Central (Mo *et al.*, 1994), y en el sur de Brasil fueron detectados anticuerpos neutralizantes en bovinos a fines de los 80’ (Cunha, 1990) no se disponía de datos publicados acerca de problemas patológicos en rumiante alguno.

Información Sanitaria de la Oficina Internacional de Epizootias, Organización Mundial de la Salud Animal (OIE, 2001), informó del aislamiento del virus en el



Noreste de la Argentina, en bovinos con infecciones asintomáticas de los departamentos de Ituzaingó y Santo Tomé en la Provincia de Corrientes. En diez departamentos de la Provincia de Misiones, asimismo, se detectaron animales con anticuerpos para el virus. Los datos recientes dan cuenta de que el serotipo circulante en la Argentina fue identificado como serotipo 4, el más antiguo conocido desde los albores de la enfermedad en África (OIE, 2002).

Problemática de estudio

La importancia sanitaria de las especies de *Culicoides* ha sido puntualizada por numerosos autores (Linley *et al.*, 1983; Wirth & Dyce, 1985; Acha & Szyfres, 1986; Boorman, 1993; Pinheiro *et al.*, 1998; Spinelli, 1998; Mellor *et al.*, 2000). Todos ellos concuerdan en que es necesario considerar las consecuencias que provocan las picaduras de los polvorines, así como el rol que estos insectos cumplen como vectores de agentes patógenos.

Los *Culicoides* son un grupo poco estudiado en nuestra región; es dificultosa su clasificación taxonómica debido principalmente al pequeño tamaño de los ejemplares adultos, que oscilan entre 1.5 a 3 mm; razón por la cual la identificación de éstos dípteros suele resultar muy tediosa. La distinción entre especies se realiza mediante claves taxonómicas basadas en características morfológicas como ser el patrón de las alas, genitalia de machos y hembras y caracteres observables en los palpos; por lo tanto la diferenciación entre especies del Género requiere de taxónomos expertos; además el montaje en láminas de cada uno de los ejemplares colectados demanda un elevado consumo de tiempo, y a su vez este procedimiento dificulta el posterior análisis molecular de los ejemplares.



El desarrollo de un método genético-molecular basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando primers específicos ofrece una posibilidad de simplificar el proceso de identificación de especies de *Culicoides*. La región del espaciador transcripto interno 1 (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.

El locus del ADNr (Figura 7) 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, con el espaciador interno (ITS-1) y el segundo espaciador (ITS-2) está localizado entre los genes 18S y 5.8S, o entre 5.8S y 28S respectivamente (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004) .

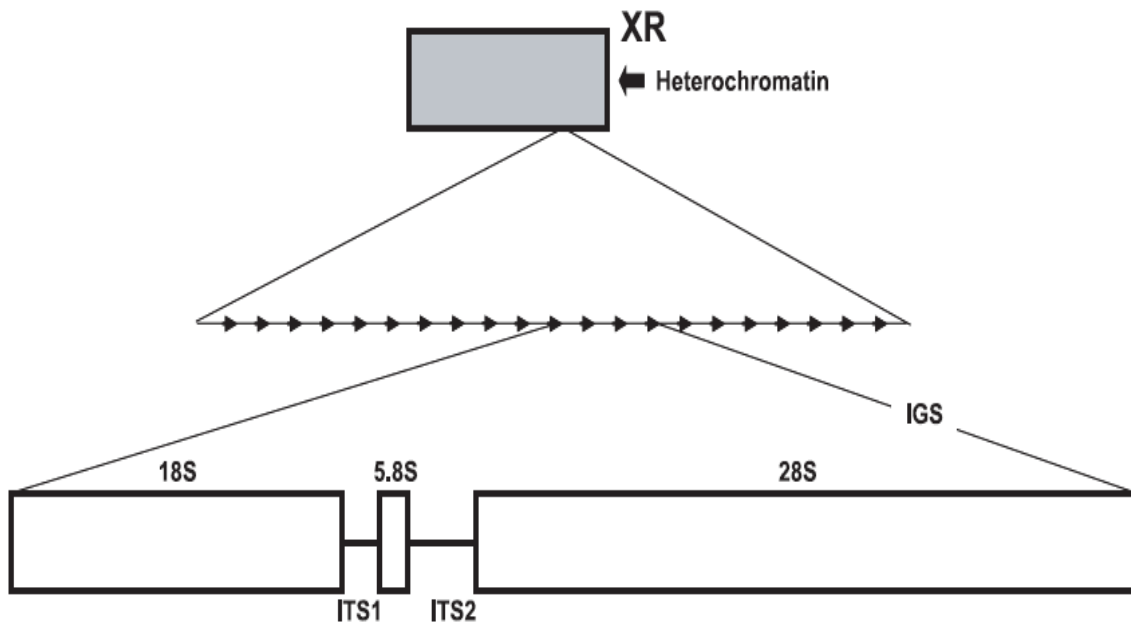


Figura 7. Localización y organización del ADN ribosomal (ADNr).



Las secuencias de los genes ARNr nuclear están muy conservadas, evolucionan muy lentamente y por lo tanto son las más utilizadas para obtener información sobre relaciones de filogenia. Las 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 (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004).

El diseño de cebadores universales dentro de zonas altamente conservadas de genes ARNr para PCR ha permitido amplificar las regiones ITS1, ITS2 e IGS en un amplio rango de organismos (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004) .

En relación con la transmisión del BTV (Bluetongue Virus o Virus de la Lengua Azul) a rumiantes, la hasta ahora amenaza potencial se puede transformar en efectiva, de acuerdo a los recientes hallazgos de anticuerpos neutralizantes en ganado bovino de nuestra provincia. Si bien, *Culicoides insignis* es el vector predominante en nuestra zona, la información disponible hasta el momento es insuficiente para excluir la posibilidad de que especies adicionales de *Culicoides* también transmitan el BTV, esto se debe a que el virus no fue aislado todavía desde potenciales vectores de la región (Ronderos *et al.*, 2003).

Aunque en la Argentina no hayan sido reportados casos de enfermedades clínicas, fue detectada la actividad viral y el virus fue aislado en rebaños centinelas en Santo Tomé, Corrientes; donde *C. insignis* fue identificado como el vector potencial más predominante (99%) capturado en cercanías de los rebaños. Por lo tanto ésta especie es considerada como el vector más probable del BTV en ésta región (Lager, 2004).



OBJETIVOS

- **GENERALES**

- ✓ Realizar la caracterización ecológica y molecular de *Culicoides insignis* Lutz en la Ciudad de Posadas.

- **ESPECIFICOS**

- ✓ Buscar y caracterizar criaderos de Ceratopogonidae, en particular de *Culicoides* en la Ciudad de Posadas.
- ✓ Optimizar un Protocolo de Extracción de ADN para ejemplares de *Culicoides spp.*
- ✓ Estandarizar las condiciones de amplificación por PCR, utilizando primers específicos para éste Género.
- ✓ Aportar al conocimiento de aspectos epidemiológicos, taxonómicos y ecológicos de estos vectores en la Región.



MATERIALES Y METODOS

La zona de trabajo (Figuras 8 y 9) corresponde al área de afectación de la Represa Yacyretá sobre el curso del Arroyo Zaimán en la Ciudad de Posadas:

- Las trampas para colecta de adultos (Tabla I) fueron colocadas en el predio del CIE (Centro de Investigaciones Entomológicas) del Parque Tecnológico Misiones, ubicado en la Ruta Nacional N° 12, Km 7, Miguel Lanús.
- El lugar de muestreo de larvas (Tabla II) se ubica sobre el margen del Arroyo Zaimán, en el Barrio Villa Poujade. En esta zona actualmente se están realizando obras correspondientes al tratamiento costero, razón por la cual ésta se presenta como un ambiente natural antropizado, lo que antes era un ambiente terrestre es ahora un valle de inundación.

Debido a la subida de la cota a nivel 83, es necesario visualizar los posibles criaderos de dípteros, atendiendo particularmente aquellos que son de importancia sanitaria (culicoides, culícidos, flebótomos, etc.), para interpretar cabalmente la situación con los nuevos perfiles del terreno.

Tabla I. Coordenadas GPS del punto de muestreo de adultos.

Punto	Coordenadas	Elevación sobre el nivel del mar
1	Lat: -27,433127; Long: -55,892865	97 m.

Tabla II. Coordenadas GPS de los puntos de muestreo de larvas.

Puntos	Coordenadas (Latitud; Longitud)	Elevación sobre el nivel del mar
1	-27,424377; -55,905636	86 m.
2	-27,42037; -55,905831	85 m.
3	-27,423580; -55,906199	84 m.
4	-27,423304; -55,905830	84 m.



Figura 8. Imagen satelital del Google Earth correspondiente a la zona de afectación sobre el A° Zaimán (Fecha 3/5/10).

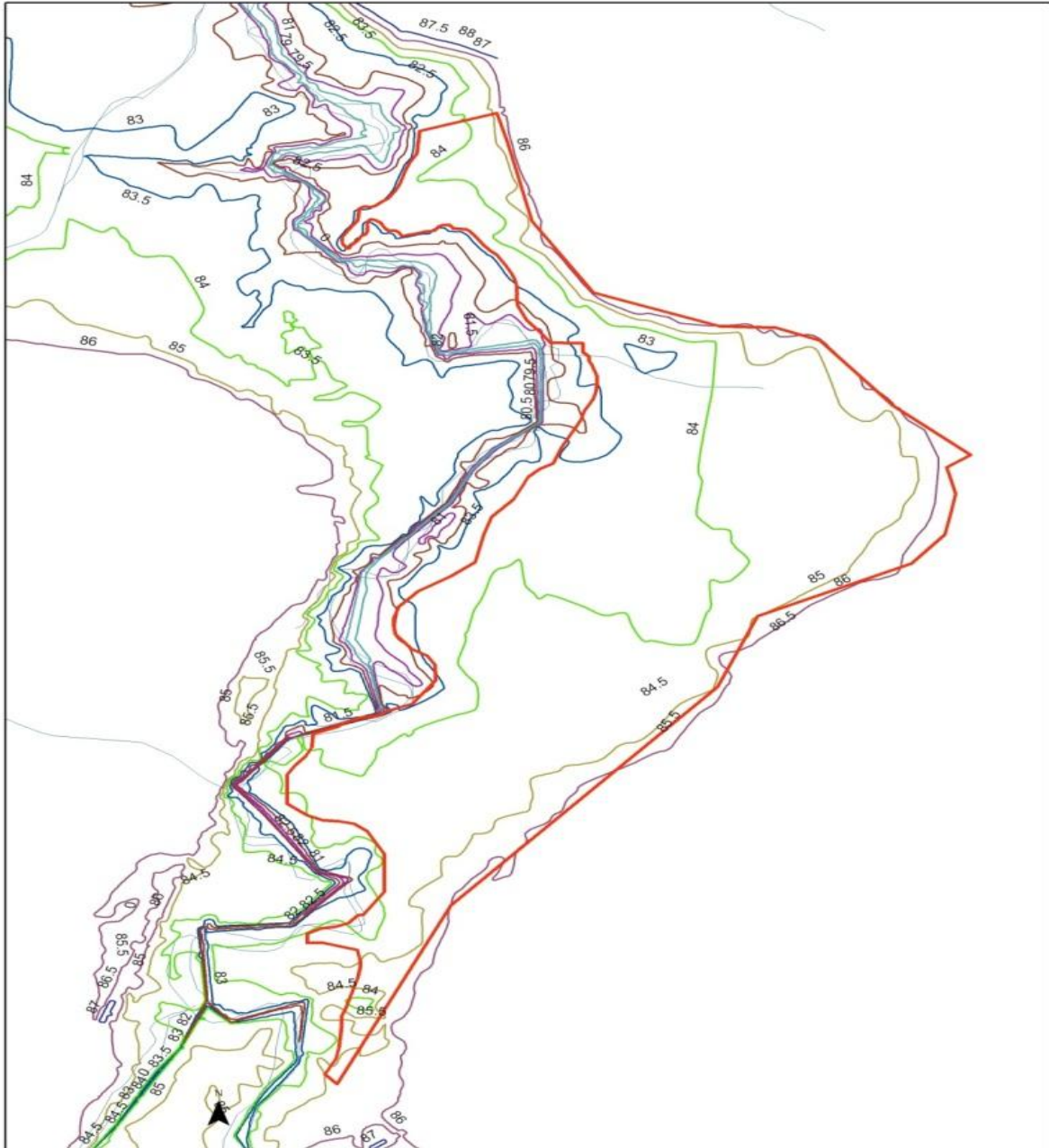


Figura 9. Zona de afectación de la Represa Yacyretá sobre el A° Zaimán. Curvas de nivel. (Gentileza EBY, Dpto: Obras Complementarias).



- **Captura de adultos y toma de datos ambientales**

Los ejemplares adultos de *Culicoides* fueron colectados con trampas de luz y trampas CDC (Centre for Disease Control, Sudia & Chamberlain, 1962) (Figura 10).



Figura 10. Trampa CDC para colecta de ejemplares adultos.

El ambiente donde se capturaron los adultos fue caracterizado atendiendo a los siguientes factores: tipo de ambiente, temperatura del aire, humedad, viento, hora de instalación y retirada de la trampa.



- **Determinación taxonómica**

Los ejemplares adultos colectados fueron llevados al laboratorio donde se realizó la identificación taxonómica de los mismos.

En primer lugar, se separaron los dípteros pertenecientes a la familia Ceratopogonidae del resto de los insectos colectados; posteriormente se apartaron ejemplares del Género *Culicoides*, en base al patrón de manchas en sus alas.

Finalmente se identificaron a los ejemplares de *C. insignis*. Se utilizó la clave taxonómica propuesta por Spinelli Gustavo y Ronderos María en el trabajo: “**The bloodsucking biting midges of Argentina (Díptera: Ceratopogonidae)**” del año 2005.

- **Búsqueda de larvas y caracterización de criaderos**

El área de muestreo fue dividido en cuatro puntos distintos (Figura 11), separados entre sí por una distancia de 30 mts. aproximadamente; en todos ellos se colectaron larvas y se midieron los parámetros fisicoquímicos como el ph y conductividad eléctrica (con pHTestrs3-Oakton resolución 0.001), transparencia (con el disco de Secchi), profundidad, temperatura del ambiente y del agua (con termómetro digital) con el fin de realizar la caracterización de los factores abióticos de los criaderos.

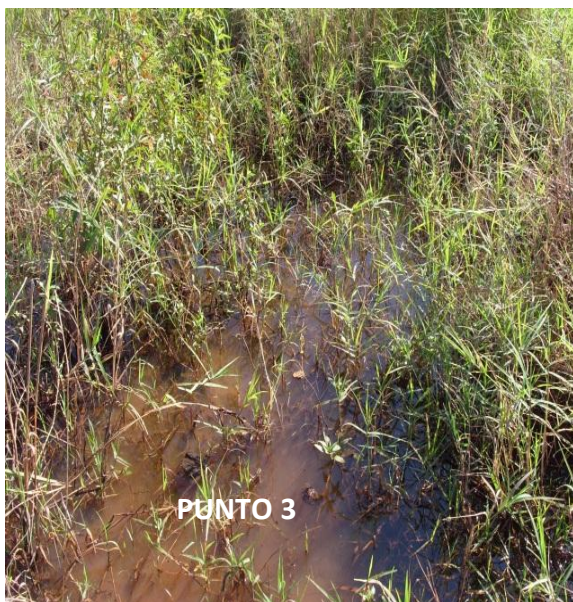
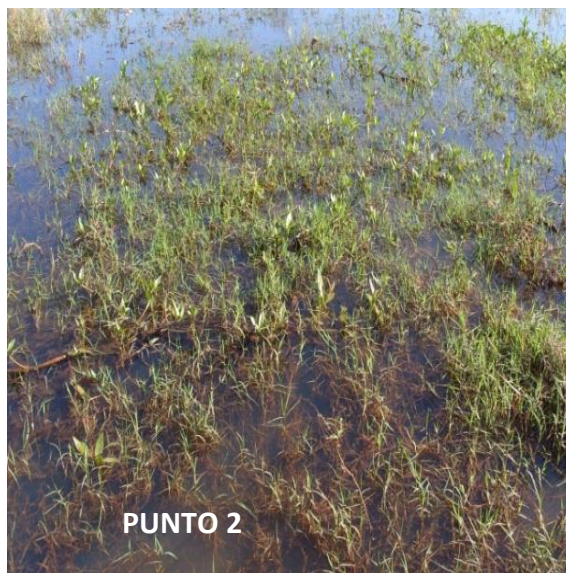


Figura 11. Puntos de muestreo de larvas de Ceratopogonidae sobre el Arroyo Zaimán.

Debido a la falta de claves taxonómicas para los estados inmaduros de Ceratopogonidae presentes en la Región, las larvas colectadas fueron llevadas al



laboratorio donde se las mantuvo bajo condiciones experimentales de laboratorio hasta alcanzar el estadio adulto.

Aquellas que no completaron su ciclo vital fueron identificadas a nivel genérico, utilizando las claves taxonómicas tentativas para los géneros más comunes propuestas por Borkent & Spinelli en el libro Biodiversidad Acuática en América Latina. Neotropical Ceratopogonidae (Diptera: Insecta). Vol. 4 del año 2.007.

- **Extracción y purificación de ADN**

Para la optimización de un protocolo de extracción de ADN para *Culicoides* se realizaron pruebas con distintos reactivos, tomando como base los protocolos de Golczer, 2008; Coen, 1982 y Martos, 2007.

Se trabajó con 8 tubos compuestos por 5 ejemplares de *Culicoides spp.* cada uno. De manera individual cada eppendorf fue sometido a distintos ensayos correspondientes a los pasos de disrupción celular y purificación del ADN.

Para la disrupción celular se ensayaron diferentes combinaciones de los detergentes SDS y CTAB en tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM, EDTA 50 mM, ClNa 0,1M), de la misma manera se realizaron pruebas con sacarosa.

Para la purificación de ADN se ensayaron tres métodos: precipitación salina de proteínas (Ac K), extracción con solventes orgánicos (Cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1), y una combinación de ambos métodos. Los ensayos se resumen en la Tabla I.



Tabla III: Detalle de reactivos agregados al Buffer de Lisis (Tris/HCl 100 mM, EDTA 50 mM y CINA 0,1M) en 8 tubos eppendorf.

Paso	Ensayo	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8
Disrupción celular	SDS 2%			X	X			X	X
	SDS 0.5%	X	X			X	X		
	CTAB 2%	X		X		X		X	
	Sacarosa	X	X	X	X				
Purificación de ADN	Precipitación salina	X	X	X	X	X	X	X	X
	Extracción con solventes	X	X	X	X	X	X	X	X
	Combinación de ambos	X	X	X	X	X	X	X	X

La integridad de los ácidos nucleicos extraídos, fue estimada en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio y observado con un Transiluminador UV Modelo MUV21-312-220, Serial N° 0807180003; utilizándose en cada pocillo 3 μ L del ADN extraído y 1 μ L de buffer de carga. Se fotografió con un Kit Cannon Power Shot G10 G4.

Estos ADN fueron utilizados para establecer las condiciones óptimas de amplificación de secuencias ITS-1 mediante PCR.



- **Amplificación por PCR**

Para la amplificación por PCR se utilizaron primers específicos para el Género *Culicoides* PanCulF y PanCulR (Tabla II), que amplifican las regiones altamente conservadas que flanquean al ITS1.

Tabla IV. Detalle de cebadores PanCul-F y PanCul-R Eurofins MWG Operon, incluyendo secuencia, contenido de GC y Th (Temperatura de hibridación).

Primer	Secuencia de 5´ a 3´	% Contenido GC	Th
PanCul-F	GTAGGTGAACCTGCGGAAGG	60	64.5
PanCul-R	TGCGGTCTTCATCGACCCAT	55	62.4

Las condiciones de amplificación se llevaron a cabo según Cêtre-Sossah et al., 2004, con modificaciones, en un volumen final de 30 µl, en Buffer de PCR al 1X, Cloruro de Magnesio 2mM, dNTPs 0,2 mM, cebador sentido 10 pmol, cebador antisentido 10 pmol, Taq polimerasa 0,5 U/µl.

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94°C durante 1 minuto, luego 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C y 1 minuto a 72°C, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Se trabajó con un Termociclador Compacto Labnet, modelo MultiGene™ II Personal Thermal Cycler. En todos los ensayos se incluyeron controles negativos.

Los productos de amplificación de las secuencias ITS fueron revelados con Bromuro de Etidio en gel de agarosa al 2%, utilizando un marcador de Peso Molecular de 100 pb (Gene Ruler 100pb DNA ladder, Fermentas). La corrida electroforética se efectuó a 100mV durante 35 minutos.



RESULTADOS

1-• Obtención de muestras y caracterización de ambientes

1.1.-Captura de adultos de *Culicoides insignis*

Los adultos para realizar este trabajo fueron colectados durante el período correspondiente a julio de 2010 y marzo de 2011. La colecta se realizó con trampas CDC y trampas de luz. Durante los primeros meses de trabajo (julio a septiembre de 2010), los muestreos se realizaron con trampas CDC, aquí el número de ejemplares de *Culicoides* colectados era mínimo (n=1 a n=3). Debido a estos resultados se procedió a colocar, además de las trampas CDC, trampas de luz donde se observó que el número de adultos colectados era significativamente mayor que el número obtenido con la CDC.

La trampa de luz se revisó cada 5 días, siempre en horarios cercanos al mediodía; en dicha trampa la especie más predominante fue *Culicoides insignis* (Figura 12) alcanzando números superiores a 150 ejemplares de esta especie por muestreo en los meses correspondientes a noviembre y diciembre.

En cada colecta las hembras se encuentran mejor representadas que los machos, llegando incluso a triplicar en número a éstos.



**Figura 12. Ejemplar de *C. insignis* colectado con trampa de luz
(Imagen en lupa estereoscópica 40x)
Se observa el patrón distintivo de manchas alares.**



Tabla V. Condiciones ambientales promedio correspondientes al lugar de colocación de la trampa de luz para colecta de adultos.

Lugar de instalación de la trampa de luz	Temperatura del ambiente	Humedad del ambiente	Viento
CIE- PTMi	23.7 ° C	60.4%	1-5 km/h

Durante todo el período de muestreo se colectaron con la trampa de luz y trampa CDC otras especies de *Culicoides*, las cuales son: *C. venezuelensis* Ortíz & Mirsa, *C. pusillus* Lutz, *C. vernoni* Wirth & Blanton y *C. guttatus* Coquillet; también son abundantes otros géneros de la familia Ceratopogonidae como *Forcipomyia* Meigen (Subgénero *Lepidohelia* Kieffer y *Forcipomyia* Meigen), *Atrichopogon* Kieffer, *Monohalea* Kieffer, *Stilobezzia* Kieffer, *Alluaudomyia* Kieffer y *Downeshelea* Wirth & Grogan.

1.2.-Búsqueda de larvas de Ceratopogonidae y caracterización de los criaderos

Las larvas de Ceratopogonidae son fácilmente distinguibles de otras larvas de dípteros por su apariencia y movilidad característica (Mullen & Durden, 2002). La búsqueda activa de las mismas se realizó en un principio en cercanías a los sitios donde se instalaron las trampas CDC y de luz para el muestreo de adultos. No se obtuvieron resultados positivos.

Se procedió a instalar una trampa para estados inmaduros (Figura 13) en el predio de CIE que sirviera como posible criadero, la misma estaba compuesta por el material colectado en el campo, al cual se le agregó materia orgánica (vegetación en descomposición, barro, algas, yerba, cáscara de frutos) y agua.



Figura 13. Trampa para estadíos inmaduros colocada en CIE.

No se encontraron larvas de Ceratopogonidae en la trampa, pero ésta resultó ser muy favorable para el desarrollo de otros dípteros pertenecientes a la familia Psychodidae.

La búsqueda de larvas y potenciales criaderos se extendió 1 km y medio sobre la zona de afectación en el Arroyo Zaimán, aquí se delimitaron cuatro puntos de muestreo, de los cuales el punto N° 3 resultó ser el más productivo, en el mismo se colectaron el mayor número de larvas (n=18) de Ceratopogonidae.

Tabla VI. Número total de larvas de Ceratopogonidae encontradas en los puntos de trabajo.

Punto de muestreo	Número de larvas encontradas
1	9
2	13
3	18
4	2

Total de larvas encontradas: 42



En cada criadero se midieron los parámetros fisicoquímicos como el ph y conductividad eléctrica, transparencia y profundidad. Además se registraron otros datos como la temperatura del ambiente y del agua, porcentaje de humedad y el viento; esta información se resume en la siguiente tabla:

Tabla VII. Condiciones ambientales promedio correspondientes a los sitios de muestreo de larvas.

Punto	ph	Prof. máx (cm)	Conduc-tividad (µs)	Trans-parencia (cm)	T° agua (°C)	T° aire (°C)	Hume-dad (%)	Viento (km/h)
1	6.85	15	51.85	5	18.3	33	70	1-5
2	7.10	40	62.88	5	17.1	33	70	1-5
3	6.80	40	76.40	5	17.3	30	72	1-5
4	6.94	20	45.41	5	17.9	28	72	1-5

Vegetación asociada: *Ludwigia peploides*, *Pistia stratiotes*, *Paspalum sp*, Diatomeas, Gramíneas.

Fauna acuática asociada: Hemípteros (insectos patinadores, chinches de agua), larvas de Odonatos y de Dípteros (moscas y culícidos), Trichopteros, Coleópteros (ditíscidos).

Además se observan fásmidos (insectos palo), odonatos adultos (libélulas) y arañas.

Del total de larvas encontradas, emergieron 8 adultos, 6 de ellos pertenecientes al Género *Alluaudomyia* y 2 al Género *Forcipomyia*. No se encontraron larvas de *Culicoides*.

Las larvas que no completaron su ciclo de vida, fueron montadas en preparaciones microscópicas en Bálsamo de Canadá de acuerdo a la técnica



propuesta por Borkent & Spinelli (2007) para su determinación taxonómica, siendo también del Género *Alluaudomyia* (Figura 14).



Figura 14. Larva de Ceratopogonidae, perteneciente al Género *Alluaudomyia*.



2-• Estandarización de Técnicas moleculares: Caracterización molecular de *C. insignis*

2.1.-Optimización de un Protocolo de Extracción de ADN para ejemplares de *Culicoides spp.*

Para la optimización del Protocolo de extracción se trabajó con pooles de *Culicoides spp.* y *C. insignis* (n=5 y n=3) y se observó que los mejores resultados se obtuvieron con:

- el agregado al Buffer de Lisis de 20 µl de SDS 2%, 40 µl de CTAB 2% y 1 µl de Proteinasa K para la **disrupción celular**;
- y un lavado con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y un lavado con Ac de K para la **purificación del ADN y la remoción de proteínas** .

El protocolo de extracción de ADN estandarizado para *Culicoides sp.* es el siguiente:

- Los ejemplares conservados en alcohol 70%, fueron centrifugados durante 5 minutos a 12.000 rpm. A éstos se agregó 160 µl de Buffer de Extracción (Tris/HCl 100 mM, EDTA 50 mM y ClNa 0,1M), 20 µl de SDS 2%, 40 µl de CTAB 2% y 1 µl de Proteinasa K.
- Con una varilla de vidrio se procede a macerar la muestra; luego ésta es incubada a 65°C durante 1 hora, agitando con vórtex cada 10 minutos.
- Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 200 µl de Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1) y se agitó con vórtex para homogeneizar. Se centrifugó 5 minutos a 12.000 rpm. Se recuperó el sobrenadante trasvasándolo a otro tubo, y se agregó 150 µl de Acetato de K (3M). Se centrifugó nuevamente 5 minutos a 12.000 rpm, se descartó el precipitado



y se recuperó el sobrenadante trasvasándolo a otro tubo, al cual se agregó 1 ml de etanol absoluto para la precipitación del ADN.

- Se centrifugó 5 minutos a 12.000 rpm y se descartó por “golpe seco” el sobrenadante y se agregó 800 μ l de etanol 70%, centrifugando nuevamente 5 minutos a 12.000 rpm.
- Se descartó nuevamente el sobrenadante por “golpe seco” dejando secar el pellet a temperatura ambiente.
- El ADN fue resuspendido en 30 μ l de agua didestilada.

Una vez estandarizado el protocolo de extracción se realizaron pruebas con ejemplares individuales de *Culicoides insignis*, obtuyéndose ADN libre de contaminación con ARN y no degradado (Figura 15).

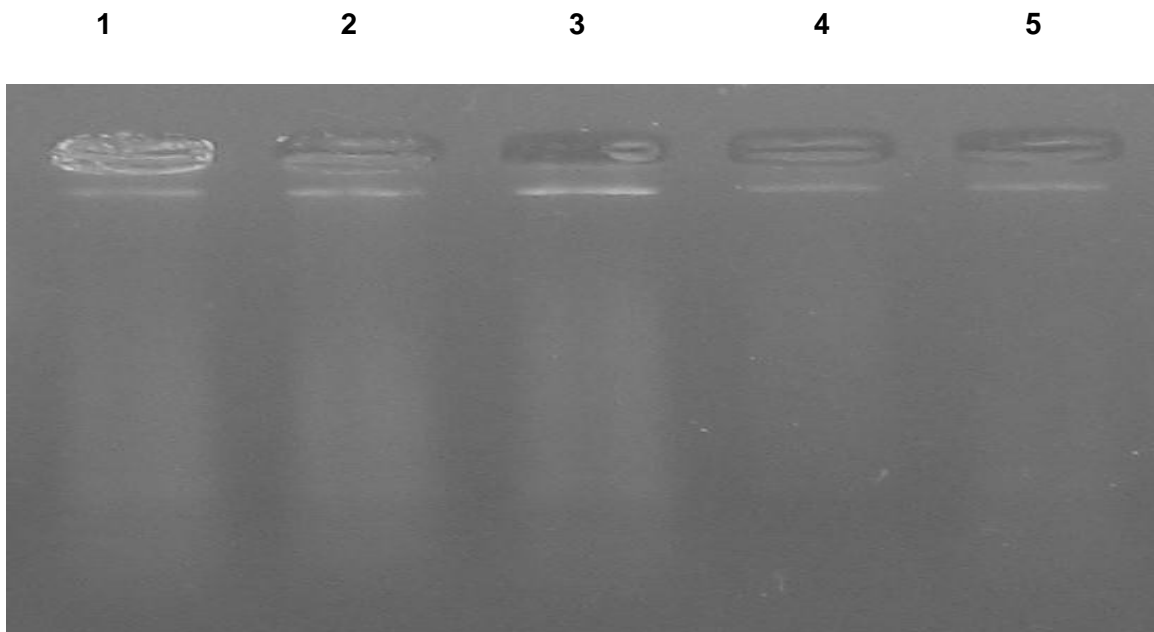


FIGURA 15. ADN genómico total extraído de ejemplares individuales de *C. insignis*, mediante el Protocolo de extracción de ADN optimizado.



2.2.-Estandarización de los parámetros de PCR

A partir del ADN extraído de un pool de *Culicoides spp.*, se amplificó la región ITS-1 utilizando primers específicos para el Género siguiendo las condiciones propuestas por Cêtre-Sossah et al. (2004).

Se realizaron pruebas con ADN puro y con diluciones 1/50, los resultados positivos provienen de muestras de ADN diluidas (Figura 16).

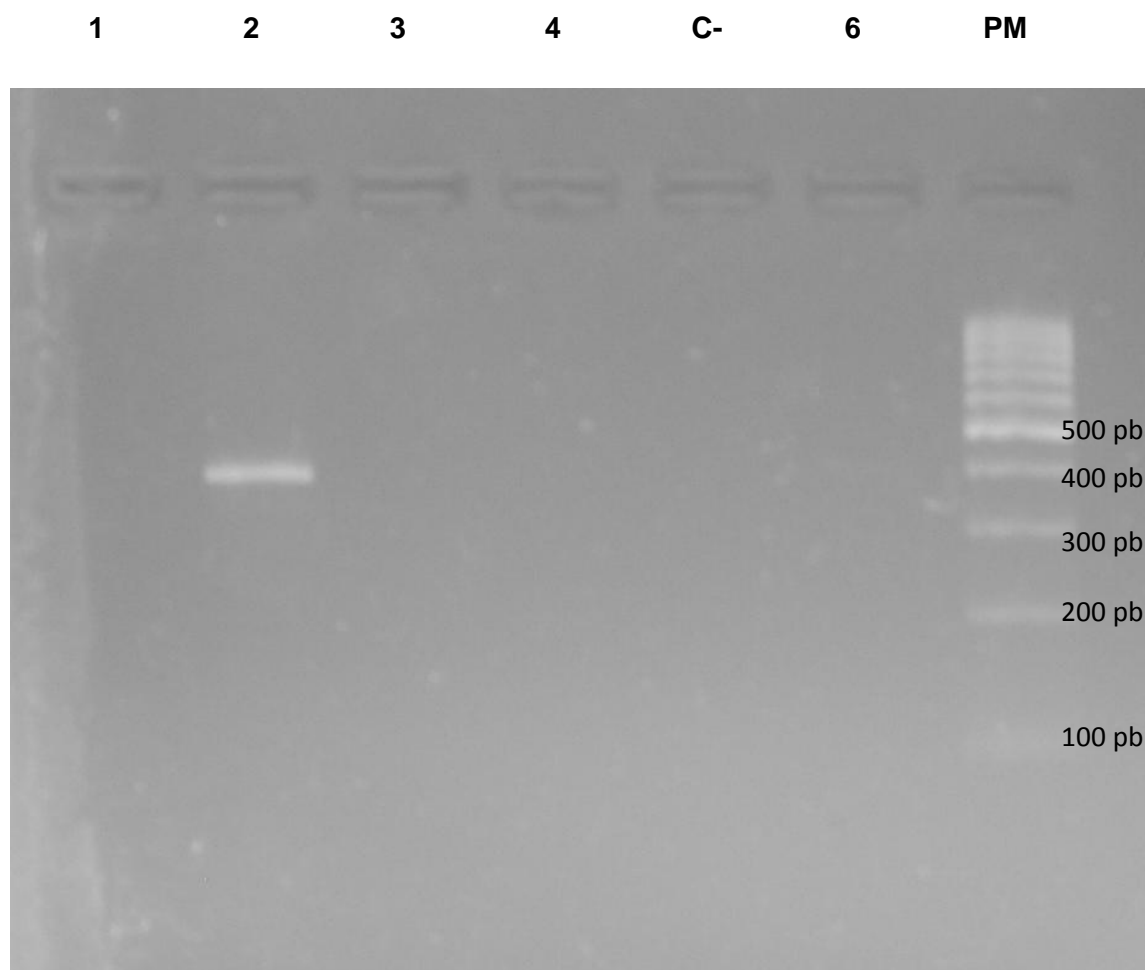


FIGURA 16. Amplificación del ITS-1 de *Culicoides spp.* por PCR utilizando (PanCulF/PanCulR). La línea 2 corresponde a una dilución 1/50 de ADN de *Culicoides spp.*, y las líneas 1, 3, 4 y 6 fueron sembradas con ADN puro. **C-:** Control negativo y **PM:** marcador de Peso Molecular de 100 pb.



Posteriormente, se realizó una amplificación a partir de las muestras de ADN extraídas a partir de *Culicoides insignis*. Tal como ocurre en muestras provenientes de pools, la amplificación del ITS-1 se consigue mediante muestras de ADN diluido 1/50. Se obtuvieron amplicones de 380 pb, acordes al tamaño esperado (Figura 17).

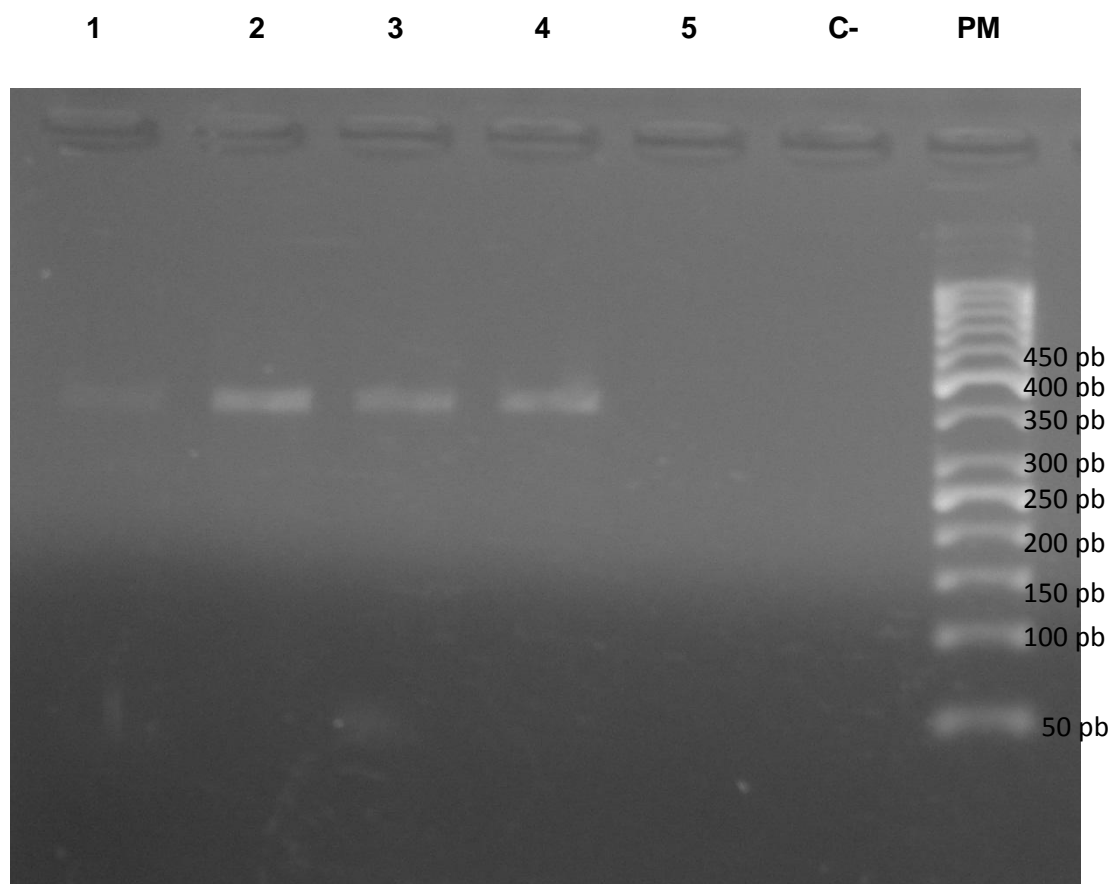


FIGURA 17. Amplificación de ITS-1 de *C. insignis* por PCR (PanCulF/PanCulR). Las líneas 1, 2, 3 y 4 corresponden a muestras de ADN diluido 1/50, la línea 5 corresponde a ADN puro. **C-**: control negativo y **PM**: marcador de Peso Molecular de 50 pb.

Como es de esperarse, no se observa banda en los carriles correspondientes al control negativo.



DISCUSION

- **Captura de adultos de *Culicoides insignis*.**

Culicoides insignis es muy abundante en nuestra zona y es considerado el principal vector del BTV (Virus de la Lengua Azul) en la Región Neotropical (Borkent & Spinelli, 2007). Si bien en la Argentina no han sido reportados casos de enfermedades clínicas, fue detectada la actividad viral y el virus fue aislado de animales pertenecientes a rebaños centinelas de Santo Tomé en el año 2000 (Lager, 2004); también se encontraron anticuerpos neutralizantes en ganado bovino de nuestra provincia (Ronderos *et al.*, 2003). Por lo tanto, el monitoreo de las especies de *Culicoides* consideradas como potenciales vectores es esencial en las áreas de riesgo, principalmente por el cuidado de la salud de los animales.

En países del primer mundo existen grupos de investigación que utilizan la taxonomía molecular para identificar aquellos vectores del BTV debido a la importancia económica que esta enfermedad representa por las pérdidas en el ganado bovino y ovino. En nuestro país, en cambio los Ceratopogónidos son un grupo poco estudiado, faltan claves taxonómicas actualizadas para las especies presentes en nuestra región y el conocimiento de los estados inmaduros es casi nulo.

En un programa de monitoreo de éstos vectores, la identificación morfológica de los *Culicoides* es crucial, pero suele resultar muy tediosa debido al tiempo que demanda su clasificación, principalmente por el pequeño tamaño que presentan los adultos. Esta es la razón por la cual se decide buscar nuevas opciones que faciliten la determinación de *Culicoides spp.* utilizando herramientas moleculares.



El número de ejemplares de *Culicoides* colectados es muy abundante en los meses donde las condiciones ambientales como la temperatura y el porcentaje de humedad son muy elevados; a diferencia de lo que ocurre en meses donde la temperatura del ambiente es baja, lo que demuestra que la emergencia del adulto se retarda cuando las condiciones del ambiente no son óptimas. A lo largo de todo el período de muestreo de adultos, la especie *C. insignis* resultó ser la más representativa, indicando que en nuestra región las condiciones ecológicas resultan favorables para su rápido desarrollo.

Se demostró también, que en comparación a la cantidad de ejemplares colectados con la trampa CDC, el número de adultos encontrados en la trampa de luz resultó ser significativamente mayor, lo que demuestra que el CO₂ utilizado en la trampa CDC no es un atractivo esencial para coleccionar los adultos de este género.

- **Búsqueda de larvas de Ceratopogonidae y caracterización de los criaderos**

Los estados inmaduros de Ceratopogonidae se hallan entre los menos conocidos de todas las familias de nematóceros, solo 11 de los 51 géneros conocidos de Ceratopogonidae Neotropicales han sido descritos como larvas sobre la base de material de esta región, mientras que otros 11 géneros se conocen como larvas a partir de material de otras regiones (Borkent & Spinelli, 2007) esto ocurre con *Culicoides insignis*, cuyos estadíos inmaduros no están descritos ni publicados para nuestra zona.

Para la realización de este trabajo, el muestreo de larvas se realizó posteriormente al muestreo de adultos. La ausencia de larvas de *Culicoides* en la



zona donde previamente se colectaron adultos indica que los lugares de desarrollo de los estados inmaduros son restringidos, y que las condiciones del ambiente no eran favorables para el desarrollo de los mismos durante el período de trabajo considerado. Además el poco conocimiento sobre la dinámica poblacional y períodos de abundancia de los adultos de *Culicoides* en nuestra región dificulta el trabajo, siendo necesario considerar muestrear en simultáneo estados inmaduros y adultos.

Los *Culicoides* se hallan relativamente bien conocidos en América del Norte y las zonas del Caribe, sin embargo las especies presentes en América del Sur han recibido comparativamente poca atención. Es por ello que tomando como referencia trabajos como ser *Observations on larval habitats of suspected Culicoides vectors of Bluetongue Virus in Florida* (Kline & Greiner, 1985) en el cual se colectan importantes cantidades de larvas de *Culicoides insignis* en muestras provenientes de charcas con abundante vegetación, zonas de barro y pasturas, y en el margen de piscinas y cunetas de desagüe; para la realización de este trabajo se consideraron como potenciales criaderos de *Culicoides* zonas con abundante barro que bordean a una vertiente de agua (en donde se colocaron trampas CDC para la captura de adultos), materia orgánica, pasto, vegetación en descomposición, etc. las cuales fueron revisadas bajo lupa estereoscópica en busca de larvas y mantenidas en el laboratorio para su seguimiento. A partir de estas muestras tomadas, se instalaron trampas (Figura 13) en el campo para obtener estadíos inmaduros de este grupo, sin embargo esto favoreció el desarrollo de otros dípteros, principalmente los pertenecientes a la Familia *Psychodidae*, como consecuencia de ello podemos concluir que ambos grupos comparten ciertas características de los criaderos donde se desarrollan. Además, posiblemente el lugar considerado para la colocación de trampas era incorrecto o la composición de las mismas no era apropiada para el desarrollo de las larvas de *Ceratopogonidae*. La carencia de material bibliográfico relacionado a hábitats de



estadios inmaduros de esta familia dificulta aún más la búsqueda de potenciales criaderos.

A una distancia aproximada de 1 y $\frac{1}{2}$ km del lugar donde se colectaron los adultos, sobre el margen del Arroyo Zaimán, se encuentra la zona de trabajo en la que se obtuvieron resultados positivos en el muestreo de larvas de Ceratopogonidae. Aquí la zona de la costa ha sufrido un relleno con tierra muy floja que permite el desarrollo de la gramilla; favoreciendo la formación de potenciales criaderos de dípteros.

En ésta área recientemente inundada se observan pastizales sumergidos y pastos de vegetación terrestre en la zona litoral, iniciándose una sucesión hacia un ambiente acuático estable. En esta transición se observa materia orgánica en descomposición, principalmente de origen vegetal. Además, los bancos de tierra que se adentran en el curso del Arroyo forman barreras para el movimiento del agua, generando zonas de aguas tranquilas en donde se colectaron las larvas.

Del total de sitios muestreados, el punto N° 3 resultó ser el más productivo. A diferencia de los otros puntos de trabajo, aquí el agua cubre lo que anteriormente era terreno cubierto de pastos, y éstos al quedar bajo el agua contribuyen a formar sectores de aguas estancadas y quietas, donde a su vez la abundante materia orgánica en descomposición y el barro proporcionan condiciones favorables para el desarrollo larval.

La falta de claves taxonómicas para los estados inmaduros de la familia imposibilita la identificación a nivel específico de las larvas colectadas durante el muestreo. Es por esto que se las debe criar en laboratorio bajo condiciones experimentales hasta que completen su ciclo de vida y emerjan los adultos. Esta tarea resulta muy difícil debido a que estas larvas son muy sensibles a los cambios de temperatura, y deben ser revisadas a diario en la lupa para corroborar



que se mantienen con vida. Cuando las condiciones no son óptimas las larvas mueren o retardan su desarrollo pudiendo permanecer en este estadio durante varias semanas, incluso un mes. Ocurre lo mismo con el estado pupal.

Si bien no se encontraron larvas de *Culicoides*, que tienen importancia sanitaria y veterinaria, se observó una cantidad considerable de larvas de otros géneros de la familia Ceratopogonidae; y debido a que los sitios donde se desarrollan los *Culicoides* son muy diversos no podemos concluir que estos grupos no compartan criaderos. Además, la presencia de los adultos de varias especies de este género, y particularmente de la especie *C. insignis*, encontrados en abundantes cantidades a lo largo de todo el período de trabajo, dan una pauta de que los estados inmaduros se están desarrollando en lugares cercanos.

Según la bibliografía el margen de dispersión de estas especies es a lo sumo pocos cientos de metros (Lucientes *et al.*, 2008), por lo tanto las cantidades de adultos observados demuestran que no es casual que se encuentren en nuestra área de trabajo. Asimismo resulta necesario realizar muestreos periódicos para confirmar la presencia de larvas de *Culicoides* en la zona, con el fin de disminuir la población del vector.

La presencia de larvas de otros géneros como *Alluaudomyia* y *Forcipomyia* indica que las condiciones ambientales en la zona de muestreo son propicias para el desarrollo de las larvas de la Familia Ceratopogonidae.

- **Optimización de un Protocolo de Extracción de ADN para ejemplares de *Culicoides* spp. y *C. insignis***

En comparación con la diversidad de protocolos de extracción de ADN descritos en otros grupos de insectos considerados vectores de enfermedades con



importancia sanitaria como son los mosquitos o triatóminos; no se conoce ningún protocolo estandarizado a partir de muestras de *Culicoides*. En todos los trabajos publicados de biología molecular aplicada a este género se emplean paquetes comerciales en combinación con nitrógeno líquido.

El uso de kits comerciales de extracción y purificación de ADN en estudios de biología molecular demanda gastos económicos elevados, es por ello necesario considerar el desarrollo de protocolos de extracción tradicionales más simples.

Si bien el pequeño tamaño de los Ceratopogónidos puede parecer una limitante para la extracción de ADN por métodos convencionales, en este trabajo se demostró que es posible extraer ADN a partir de ejemplares individuales de *Culicoides* mediante protocolos tradicionales, sin utilizar nitrógeno líquido, lo que reduce significativamente los costos.

Para la estandarización del protocolo de extracción, se obtuvieron resultados óptimos únicamente en los ensayos efectuados para la disrupción celular donde se utilizó el detergente SDS en combinación con CTAB y proteinasa K. Se observó que el agregado de sacarosa al buffer de lisis no modificó los resultados indicando que la incorporación de estos detergentes al buffer son suficientes para que ocurra la disrupción de membranas y la precipitación de organelas tras la desnaturalización y centrifugación, pudiendo iniciarse el proceso de purificación (Sambrook *et al.*, 1989).

En las pruebas realizadas para la purificación del ADN por precipitación salina, donde se ensayaron dos lavados con Acetato de K 3M, resulta necesario realizar un tercer, y en ocasiones hasta un cuarto lavado con Ac de K, debido a que se observan 2 fases bien diferenciadas, lo que imposibilita distinguir en cuál de ellas está presente el ADN. Ambas fases deben ser sometidas al mismo tratamiento posterior, lo que representa un aumento en la cantidad de pasos, implicando



mayor manipulación y mayor tiempo de proceso, resultando muy tedioso cuando se analiza un elevado número de muestras.

En contraste con los otros tratamientos de purificación ensayados, el protocolo donde se combina la extracción con solventes orgánicos y precipitación salina, es decir un lavado con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y un lavado con Ac de K, da excelentes resultados disminuyendo la cantidad de pasos y el tiempo total del proceso, minimizando así las posibles contaminaciones accidentales de las muestras durante la extracción.

No se observaron diferencias al trabajar con ejemplares frescos (recién colectados en la trampa de luz) o congelados en freezer. Lo mismo ocurre con muestras de *Culicoides* secas (en sílica gel) o conservados en alcohol, ya sea 70% o 96%, esto resulta muy importante debido a que cualquier tipo de muestra de *Culicoides* puede ser sometida a este protocolo de extracción de ADN.

La extracción de ADN estandarizada combina procesos químicos, físicos y mecánicos resumidos en cuatro pasos: lisis celular, eliminación de proteínas, precipitación y limpieza del ADN. Este método es económico, no utiliza compuestos de alta toxicidad o contaminantes del ambiente, como el fenol que es un compuesto fácilmente oxidable, cuyos productos pueden interferir en la posterior amplificación por PCR (Sambrook *et al.*, 1989). Se obtuvo ADN amplificable, sin necesidad de utilizar RNAsas, ni re-purificar o re-precipitar el ADN lo que evidencia su buena calidad.

- **Estandarización de los parámetros de PCR**

La calidad y cantidad de ADN molde afecta la eficiencia de la reacción de amplificación, en este trabajo se observó que la sensibilidad de la técnica



aumentó considerablemente cuando el ADN fue diluido antes de la amplificación. Se demostró también que un único ejemplar de *Culicoides insignis* fue suficiente para obtener productos de PCR.

Los resultados positivos de esta técnica en muestras de otros *Culicoides* menos abundantes que *C. insignis* confirman que la región amplificada por los primers es altamente conservada en las especies de este Género.

Se obtuvieron amplicones acordes al tamaño esperado, que oscilan entre 316 y 500 pb (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004). Para la especie *C. insignis* se obtuvieron amplicones de 380 pb, esto es de suma importancia ya que hasta la fecha no existen antecedentes en la caracterización molecular de esta especie en nuestra Región, como tampoco en la aplicación de herramientas moleculares al estudio de los *Culicoides* presentes en la misma.

Este trabajo entonces facilitará los estudios moleculares posteriores, sean análisis poblacionales o de filogenia, ya que representa una alternativa efectiva para obtener suficientes muestras de ADN a partir de estos pequeños dípteros.



CONCLUSIONES

- Se optimizó un protocolo de extracción de ADN para ejemplares adultos de *Culicoides insignis* Lutz.
- Se ajustaron los parámetros de reacción para la amplificación de ADN mediante la técnica de PCR utilizando primers específicos para el Género.
- Se caracterizaron criaderos de especies de la Familia Ceratopogonidae, aportando al conocimiento de la ecología de estos dípteros en la Región.



PERSPECTIVAS

En función de los resultados alcanzados en esta investigación se sugiere avanzar en:

- Profundizar y actualizar el estado de la Familia Ceratopogonidae en nuestra Región, puesto que las condiciones del ambiente resultan favorables para su desarrollo y existen poco estudios realizados in situ del grupo en cuestión.
- Debido a que no se encontraron larvas de *Culicoides insignis*, es necesario realizar muestreos más intensivos principalmente en los períodos donde se colectaron adultos, con el fin de caracterizar ecológicamente los estados inmaduros de esta especie y conocer los períodos de abundancia de la misma.
- Evaluar el uso de la Técnica de Flotación en solución saturada de azúcar (Uslu & Dik, 2006) para la remoción de larvas desde la muestra tomada en el hábitat natural.; como así también el uso de la trampa de emergencia (Carrasquilla *et al.*, 2010) en lugares donde se ha confirmado la presencia de larvas de la Familia Ceratopogonidae.
- Secuenciar el producto de la amplificación por PCR y diseñar un primer específico para *Culicoides insignis*.
- Optimizar el Protocolo de Extracción de ADN y las condiciones de PCR para estadios larvales de Ceratopogonidae.



-
- Conocer el estado sanitario de los rumiantes presentes en la zona para determinar si existe infección.
 - Determinar la actividad viral del BTV en la Provincia de Misiones.



BIBLIOGRAFIA

- Acha, P. N. & Szyfres, B., 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. OPS, Publicación Científica n° 503, Washington C. 989 pp.
- Boorman, J., 1993. Biting midges (Ceratopogonidae). Volume 2: 349-368. In: Contribution to a Manual of Palearctic Diptera (L. Papp & B. Darvas, Eds). Budapest: Sci. Herald.
- Borkent, A. & Spinelli, G.R., 2007. Biodiversidad Acuática en América Latina. Neotropical Ceratopogonidae (Diptera: Insecta). Vol. 4: 1-200.
- Borkent, A. & Wirth, W. W., 1997. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 233:1-257.
- Carrasquilla, M., Guhl, F., Zipa, Y., Ferro, C., Pardo, R., Cabrera, O., Santamaría, E., 2010. Breeding sites of *Culicoides pachymerus* Lutz in Magdalena River basin, Colombia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Vol 105 (2):216-219.
- Cêtre-Sossah, C., Baldet, T., Delecolle J.C., Mathieu, B., Perrin A., Grillet C. & Albina, E., 2004. Molecular detection of *Culicoides spp.* and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. Vet. Res. 35:325-337.



-
- Coen, E.S., Thoday, J.M. & Dover, G., 1982. Rate of turnover of structural variants in the rADN gene family of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 295:564-568.
 - Convenio EBY-UNaM / Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Vigilancia Epidemiológica. Seguimiento de criaderos de mosquitos vectores de interés sanitario. Primer Informe de avance 2009-2010.
 - Cunha, R. G., 1990. Anticorpos neutralizantes em soros de ruminantes domésticos do Brasil frente aos diferentes serotipos do virus da lingua azul. *Rev. Bras. Med. Vet.* 12:3-7.
 - Gibbs, E. P. J. & Greiner, E. C., 1994. The epidemiology of bluetongue. *Comp. Immunol. Microb.* 17:207-220.
 - Golczer, G. & Arrivillaga, J., 2008. Modificación de un protocolo estándar de extracción de ADN para flebotómíneos pequeños (Phlebotominae: *Lutzomyia*). *Revista Colombiana de Entomología* 34 (2), 199-202.
 - Gorchs, C. & Lager, I., 2001. Actualización sobre el Agente y la Enfermedad. *Rev. Argent. Microbiol.* 33:122-132.
 - Hoch, A.L., Roberts, D.R. & Pinheiro, F.P., 1990. Hot-seeking behavior and seasonal abundance of *Culicoides paraensis* ((Diptera: Ceratopogonidae) in Brasil. *J. Am. Mosquito Contr.* 6:110-114.



-
- Holbrook, F.R., 1996. Biting midges and the agents they transmit, p. 110-116. In: The Biology of Disease Vectors (B. J. Beaty, & W. C. Marquardt, Eds.), University Press of Colorado, Niwot.
 - Kline, D.L. & Greiner E.C., 1985. Observations on larval habitats of suspected *Culicoides* vectors of BluetongueVirus in Florida. "Bluetongue and Related Orbiviruses." New York: AR Liss, pag 221-227.
 - Lager, I. A., 2004. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Veterinaria Italiana* 40 (3), 89-93.
 - Lager, I. A., 2004. Incidence and isolation of bluetongue virus infection in cattle of the Santo Tomé Department, Corrientes Province, Argentina. *Veterinaria Italiana* 40 (3), 141-144.
 - Leduc J.W., Hoch A.L.,Pinheiro F.P. & Travassos, Da Rosa, A.p.,1983. Epidemic Oropouche virus disease in Northern Brazil, *Bull Pan Am Health Organ* 15: 97-103.
 - Linley, J. R.; Hoch, A. L. & Pinheiro, F. P., 1983. Biting midges and human health. *J. Med. Entomol.* 20:347-364.
 - Lucientes, J., Calvete, C., Estrada, R., Miranda, M.A., Del Rio, R. & Borrás, D., 2008. Los vectores de la Lengua Azul: conocimientos básicos de su bioecología. *El Programa Nacional de Vigilancia Entomológica de la Lengua Azul en España.*



-
- Maclachlan, N. J., 1994. The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. *Comp. Immunol. Microb.* 17:197-206.
 - Martos Y.V., Insaurralde D.R., Zapata P.D., 2007. Estandarización de un método de extracción de DNA para la amplificación del gen col para la caracterización molecular de especies de dípteros (Sarcophagidae) de la provincia de Misiones. Argentina. *Journal of Basic and Applied Genetics (Suplemento de la Revista de la Sociedad Argentina de Genética, Actas XXXVI Congreso Argentino de Genética); Volumen 18; ISSN BAG 1666-0390; páginas 80-81.*
 - Matsumoto, Y., Yanase, T., Tsuda, T. & Noda, H., 2009. Species-specific mitochondrial gene rearrangements in biting midges and vector species identification. *Med. Vet. Entomol.* 23: 47-55.
 - Matsumoto, Y., Yanase, T., Tsuda, T. & Noda, H., 2009. Characterization of Internal Transcribed Spacer (ITS1)-ITS2 Region of Ribosomal RNA Gene from 25 species of *Culicoides* Biting Midges (Díptera: Ceratopogonidae) in Japan. *J. Med. Entomol.* 45 (5):1099-1108.
 - Mellor, P. S.; Boorman, J. & Baylis, M., 2000. *Culicoides* Biting Midges: Their role as Arbovirus vectors. *Ann. Rev. Entomol.* 45:307-340.
 - Mo, C. L.; Thomson, L. H.; Homan, E. J.; Oviedo, M. T.; Greiner, E. C.; Gonzalez, J. & Saenz, M. R., 1994. Bluetongue virus isolations from vectors and ruminants in Central America and the Caribbean. *Am. J. Vet. Res.* 55 (2):211-215.



-
- Mullen, L. and Durden, L. 2002. Medical and Veterinary Entomology. Academic Press (Elsevier). 597p. ISBN-13: 978-0-12-510451-7
 - Nolan, D.V., Dallas, J.F. & Mordue, A.J., 2004. Molecular taxonomy and population structure of a *Culicoides* midge vector. Vet. Ital. 40 (3), 352-359.
 - Obdein, M., 1984. Bluetongue. A review of the disease. Pan American Foot and Mouth Disease Center, Cientific and Technical Monograph Series, N°16.
 - OIE. 2001. Organización Mundial de la Salud Animal. Informaciones Sanitarias. 14 (41):1-16.
 - OIE. 2002. Organización Mundial de la Salud Animal. Informaciones sanitarias. 15 (27):5.
 - Pagés, N., Muñoz-Muñoz, F., Talavera, S., Sarto, V., Lorca, C. & Núñez, J.I., 2009. Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the Subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. Veterinary Parasitology 165: 298-310.
 - Perruolo, G.J., 2009. Clave de las especies de *Culicoides* (Díptera: Ceratopogonidae) asociadas con la ganadería en la Región Neotropical. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XIX, N° 2, 124 – 133.



-
- Pinheiro, F. P.; Freitas, R. B.; Travassos Da Rosa, J. F.; Garyay, Y. B.; Mello, W. A. & Leduc, J. W., 1981. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological finding. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30 (3):674-681.
 - Pinheiro, F.P.; Travassos Da Rosa, A. P. A. & Vasconcelos, P. F. C., 1998. An overview of Oropouche fever epidemics in Brazil and neighbor countries, p.187-192. In: An overview of Arbovirology in Brazil and neighboring countries. (A. P. A. Travassos Da Rosa, P. F. C. Vasconcelos & J. F. S. Travassos Da Rosa, Eds.), 296 pp. Instituto Evandro Chagas, Belem.
 - Ronderos, M.M., & Spinelli, G.R., 1998. Las especies de *Culicoides* en el área de influencia de la represa de Yacyretá (Diptera: Ceratopogonidae). *Revista. Soc. Entomol. Argent.* 57: 79-83.
 - Ronderos, M. M.; Spinelli, G. R.; Lager, I. & Díaz, F., 2003. La importancia sanitaria de los jejenos del Género *Culicoides* (Díptera: Ceratopogonidae) en la Argentina. *Entomol. Vect.* 10 (4): 601-612.
 - Ronderos, M. M., Greco, N. & Spinelli, G.R., 2003. Diversity of Biting Midges of the Genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) in the Area of the Yacyretá Dam Lake between Argentina and Paraguay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Vol 98: 19-24.
 - Saenz, M. R. & Greiner, E. C., 1994. *Culicoides* aspirated from cattle in Costa Rica, Honduras, Panama and Puerto Rico, and their role as potential vectors of bluetongue viruses. *Rev. Med. Vet. Entomol.* 8:15-19.



-
- Sambrook, J. *et al.*, 1989. "Molecular cloning: a laboratory manual" New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 - Sellers R. F., 1981. Bluetongue and related diseases. In: Gibbs E.P.J. ed. Virus Diseases of Food Animals. London, UK: Academic Press, 567-584.
 - Shelley, A. J. & Coscaron, S., 2001. Simuliid blackflies (Diptera: Simuliidae) and ceratopogonid midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Onchocercidae) in northern Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96:451-458.
 - Sherlock I. A. & Guitton, N., 1965. Dermatozoonosis by *Culicoides*' bite (Diptera: Ceratopogonidae) in Salvador, State of Bahia, Brasil, IV. A clinical study. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Vol 63: 27-37.
 - Spinelli, G.R., 1992. Virus and filaria transmission by Ceratopogonidae. A biosystematic study of the Neotropical species of the *Culicoides diabolicus* group. Robert S. McNamara Fellowships Program, Annu. Report.:45-47.
 - Spinelli, G. R., 1998. Ceratopogonidae, 314-326. In: Biodiversidad de Artrópodos Argentinos. (J. J. Morrone & S. Coscarón, Eds.), 599 pp. Ediciones Sur, La Plata, Argentina.
 - Spinelli, G.R. & Ronderos, M.M., 2005. Ceratopogonidae (Formas hematófagas). Publicación Mundo Sano. Artrópodos de interés médico en Argentina. Serie Enfermedades Transmisibles. 6:61-66.



-
- Spinelli, G.R., Ronderos, M.M., Díaz, F. & Marino, P., 2005. The bloodsucking biting midges of Argentina (Diptera: Ceratopogonidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Vol. 100: 137-150.
 - Spruell, J., 1902. Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa. J. Comp. Pathol. 18:321-337.
 - Stephan, A., Clausen, P.-H., Bauer, B. & Steuber, S., 2009. PCR identification of *Culicoides dewulfi* midges (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of bluetongue in Germany. Parasitol. Res. 105:367-371.
 - Sudia, W. & Chamberlain, R.W., 1962. Battery operated light trap, an improved model. Mosquito News 22, 126-129.
 - Tanya, V.N., Greiner, E.C. & Gibbs, E.P.J., 1992. Evaluation of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus. Vet. Microbiol., 32: 1-14.
 - Urbano, P. & Urbano, F. G., 1994. The Reoviridae family. Comp. Immunol. Microb. 17:151-161.
 - Uslu, U. & Dik, B., 2006. Vertical distribution of *Culicoides* larvae and pupae. Medical and Veterinary Entomology 20, 350-352.
 - Wirth, W. W. & Dyce A. L., 1985. The current taxonomic status of the *Culicoides* vectors of bluetongue viruses, p. 151-164. In: Bluetongue and related arboviruses. (T.L. Barber & M.M. Jochim Eds.), 746 pp. Alan R. Liss, New York.



-
- Wirth, W.W., Dyce, A.L. & Spinelli, G.R., 1988. An atlas of wing photographs, with a summary of the numerical characters of the Neotropical species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). Contrib. Am. Entomol. Inst 25: 1-72.



INDICE

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCION	
Familia Ceratopogonidae.....	5
Género <i>Culicoides</i>	8
Importancia Sanitaria en la Argentina	
Picaduras y Alergias.....	12
Enfermedades transmisibles.....	13
Problemática de estudio.....	18
OBJETIVOS.....	21
MATERIALES Y METODOS	
Descripción general de la zona de trabajo.....	22
Captura de adultos y toma de datos ambientales.....	25
Determinación taxonómica.....	26
Búsqueda de larvas y caracterización de criaderos.....	26
Extracción y purificación de ADN.....	28
Amplificación por PCR.....	30



RESULTADOS

1-Obtención de muestras y caracterización de ambientes	
1.1-Captura de adultos de <i>Culicoides insignis</i>	31
1.2- Búsqueda de larvas de Ceratopogonidae y caracterización de criaderos.....	33
2-Estandarización de Técnicas moleculares	
2.1- Optimización de un Protocolo de Extracción de ADN para ejemplares de <i>Culicoides spp.</i>	37
2.2- Estandarización de los parámetros de PCR.....	39

DISCUSION

Captura de adultos de <i>Culicoides insignis</i>	41
Búsqueda de larvas de Ceratopogonidae y caracterización de criaderos.....	42
Optimización del protocolo de extracción de ADN.....	45
Estandarización de parámetros de PCR.....	47

CONCLUSIONES.....	49
-------------------	----

PERSPECTIVAS.....	50
-------------------	----

BIBLIOGRAFIA.....	52
-------------------	----

**Formulario de autorización de depósito de tesis/trabajo final integrador en la
 Comunidad Ciencias Exactas, Químicas y Naturales del RIDUNaM
 (Repositorio Institucional Digital de la UNaM)**

Por intermedio de la presente, el abajo firmante, AUTOR de la Tesis/TFI (Grado) titulada/o
Caracterización... ecológica... y... molecular... de... bacterias... resistentes
 Da FE de la autoría y originalidad de la obra mencionada, que fue dirigida por, *Walantus...
 Leonardo... Horacio... y... Zapata... Pedro... Darío...*
 presentada y defendida en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad
 Nacional de Misiones (FCEQyN-UNaM), el (fecha) *... 1 / 9 / 11 ...*, Acta/Expte.
 N° *... 53398 ...*, con el fin de obtener el título de *... Licenciada... en... Genética...*

Tildar según corresponda

- Tesis de Posgrado
 Doctorado Maestría Trabajo Final Integrador
 Tesis de Grado

Derechos patrimoniales




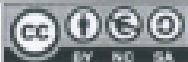
Como autor, expreso mi conformidad en cuanto a la cesión gratuita de los derechos de reproducción y circulación de esta obra, en forma NO EXCLUSIVA, a la Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales-UNaM. Dicha reproducción y circulación se podrá realizar, una o varias veces, en cualquier soporte, para todo el mundo, con fines sociales, educativos y científicos.
 En virtud del carácter no-exclusivo de esta cesión, el autor podrá reproducir y comunicar libremente la tesis o trabajo final integrador, a través de los medios que estime oportunos.

Condiciones de acceso en línea

- Autorizo el depósito de la tesis o trabajo final integrador en forma inmediata
 Autorizo el depósito del documento con embargo por el plazo de _____ meses a partir de la defensa de la misma.

Condiciones de uso de la tesis/TFI

Será puesta a disposición pública bajo las siguientes condiciones de uso:

	(BY) Atribución — Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciante (para no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o que respalda el uso que hace de su obra).
	(NC) No Comercial — No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
	(SA) Permite trabajos derivados — Siempre que se mantenga la misma licencia.
	Reconocimiento - NoComercial - Compartir Igual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original.

Referencias:
 CC (Licencia Creative Commons),
 BY (Atribución),
 NC (No comercial),
 SA (Compartir igual).

Dados personales (llenar un cuadro por cada autor)

Apellido y Nombres	AYALA MARIA MARIEL
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	ayalamaria@gmail.com

Apellido y Nombres	
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	

Apellido y Nombres	
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	

Se firma la presente en la Ciudad de Posadas, Misiones a los⁹..... días del mes
de septiembre de 2025.

Ayala Maria

9/9/25 La Plata, BS AS