

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO *CULICOIDES* EN GRANJAS BOVINAS DE LA REGIÓN OCCIDENTAL DE CUBA

Morphological and molecular identification of *Culicoides* species in bovine farms of the western region of Cuba

✉ Ana María Acevedo Beiras^{1*}, ✉ Maray Curiel Hernández^{1*}, ✉ Melisa Ruiz Mir¹, ✉ Yalaine Obret Ferrer¹,
✉ Cristian Díaz-Corona¹, ✉ Carmen Laura Perera González¹, ✉ Nonito Pages Martínez²

¹Grupo de Virología Animal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA),
Apartado 10, San José de las Lajas, CP 32 700, Mayabeque, Cuba.

²CIRAD/INRA UMR ASTRE (Animal, Santé, Territoires, Risques et Ecosystèmes),
CRVC - Centre for Research and surveillance on Vector-borne diseases in the Caribbean.
Domaine Duclos-Prise d'Eau, 97170-Petit Bourg, Guadeloupe, France

RESUMEN: El presente estudio tuvo como objetivo identificar las especies del género *Culicoides* en granjas bovinas de la región occidental de Cuba. La investigación se basó en la captura de ejemplares en diferentes granjas, su clasificación morfológica mediante claves taxonómicas basadas en el patrón de manchas alares y la confirmación de su identidad por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante la amplificación del gen que codifica la subunidad I del Citocromo Oxidasa (COI). Se identificaron morfológica y molecularmente dos especies de *Culicoides* (*C. insignis* y *C. hoffmani*) en granjas bovinas de La Habana y Mayabeque, lo que constituye el primer reporte documentado en estos entornos productivos de Cuba. La aplicación de una clave dicotómica del patrón alar permitió una identificación morfológica precisa, mientras que la técnica de PCR con cebadores universales para el gen COI demostró ser una herramienta complementaria eficaz, especialmente bajo condiciones optimizadas (variante Touchdown). Este trabajo constituye un aporte pionero en Cuba, al integrar herramientas moleculares en estudios de *Culicoides* asociados a la ganadería y al reforzar la necesidad de vigilancia entomológica y virológica en sistemas productivos bovinos, así como el diseño de estrategias de control de enfermedades transmitidas por vectores.

Palabras clave: *Culicoides*, identificación morfológica y molecular, PCR.

ABSTRACT: The present study aimed to identify species of the genus *Culicoides* in bovine farms of the western region of Cuba. The research involved capturing specimens in selected farms, morphologically classifying them through taxonomic keys based on wing spot patterns, and confirming species identity by polymerase chain reaction (PCR) for the amplification of the gene encoding Cytochrome Oxidase subunit I (COI). Two species of *Culicoides* (*C. insignis* and *C. hoffmani*) were morphologically and molecularly identified in bovine farms located in Havana and Mayabeque, constituting the first documented report in these productive environments of Cuba. The application of a dichotomous key of the wing pattern allowed precise morphological identification, while the PCR technique using universal primers for the COI gene proved to be an efficient complementary tool, especially under optimized conditions (Touchdown variant). This work constitutes a pioneering contribution in Cuba by integrating molecular tools into studies of *Culicoides* associated with livestock farming and by reinforcing the need for entomological and virological surveillance in bovine production systems as well as the design of vector-borne disease control strategies.

Key words: *Culicoides*, morphological and molecular identification, PCR.

*Ambos autores contribuyeron en igualdad de condiciones.

*Correspondencia a: Ana María Acevedo Beiras. E-mail: acevedobeiras@gmail.com

Recibido: 10/03/2026

Aceptado: 01/04/2026

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Contribución de los autores: Conceptualización, Curación de datos, Análisis Formal, Investigación, Redacción - borrador original, Redacción - revisión y edición: Ana María Acevedo Beiras. Conceptualización, Curación de datos, Análisis formal: Maray Curiel Hernández. Curación de datos, Análisis formal: Melisa Ruiz Mir. Curación de datos, Análisis formal: Yalaine Obret Ferrer. Curación de datos, Análisis formal: Cristian Díaz-Corona. Conceptualización, Análisis formal, Administración del proyecto, Redacción - revisión y edición: Carmen Laura Perera González. Conceptualización, Curación de datos, Análisis formal, Investigación, Administración del proyecto, Redacción - revisión y edición: Nonito Pages Martínez.



Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0).
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



Los *Culicoides* son dípteros hematófagos. Aproximadamente el 96% de las especies se alimentan de sangre de vertebrados, principalmente de mamíferos e incluso de seres humanos; de ahí que desempeñan un papel importante en la transmisión de patógenos virales y parasitarios de interés veterinario y para la salud pública (1, 2). Se han aislado de *Culicoides spp.* más de 50 arbovirus de importancia en medicina veterinaria, entre los que se destacan (a) el virus de la lengua azul (VLA); (b) la enfermedad hemorrágica epizootica (VEHE); (c) la peste equina africana (PEA); (d) la estomatitis vesicular (VEV) y (e) Schmallenberg (SBV), cuya distribución geográfica se va incrementando debido al cambio climático y al calentamiento global, generando la emergencia o reemergencia de estos agentes virales (3-6). Para la salud humana tienen gran importancia como vectores del virus de Oropouche (OROV).

En Cuba, García (7) informó que la familia *Ceratopogonidae* está representada por alrededor de siete especies conocidas de “jejenes”. Las más importantes son *Culicoides furens* y *Leptoconops becquaerti*, ambas de hábitats costeros. La primera está distribuida a lo largo de todas las costas cubanas, mientras la segunda está limitada a las costas de las regiones central y oriental de Cuba. Ambas especies causan gran molestia al hombre y a los animales que viven cerca de las costas. Además, se describen otras especies de *Culicoides* como *Culicoides barbosa* (8), *Culicoides gorgasi* (9), *Culicoides hoffmani* (10), *Culicoides insignis* y *Culicoides pusillus* (11).

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 (8, 12, 13). 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* (14). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos para este género, unido a la secuenciación del genoma ofrece una posibilidad de reforzar el proceso de identificación de los *Culicoides* (15, 16).

En Cuba, existen reportes de especies costeras de *Culicoides* (7), pero no se han realizado estudios recientes en sistemas ganaderos que incluyan la confirmación molecular. El objetivo del presente trabajo fue identificar las especies del género *Culicoides* presentes en granjas bovinas de la región occidental de Cuba, mediante técnicas morfológicas y moleculares.

Para la captura y colección de los *Culicoides* se seleccionaron tres granjas bovinas situadas en la región occidental de Cuba (La Habana y Mayabeque) donde se habían identificado previamente diferentes serotipos del VLA (17) (Tabla 1).

Las capturas de *Culicoides* se realizaron con trampas de aspiración tipo CDC, dotadas de una fuente de luz

ultravioleta (Miniature CDC Light Trap, EE.UU.), entre los meses de octubre a noviembre de 2024 con una frecuencia de tres días seguidos en cada granja. Cada día, desde las 18:00 horas hasta las 06:00 horas del día siguiente, se colocaron tres trampas en distintos puntos de las unidades bovinas en una ubicación en forma de triángulo, a una altura entre 1.50 y 2 metros por encima del suelo y a una distancia de 1 a 5 metros del lugar donde se encontraban los rebaños. Los especímenes se preservaron en etanol al 70%.

La identificación morfológica se realizó en el laboratorio del CRVC de la UMR-ASTRE del CIRAD de Guadalupe, donde se procedió a separar los dípteros pertenecientes a la familia *Ceratopogonidae* del resto de los insectos. Posteriormente, se realizó la clasificación de los ejemplares del género *Culicoides* basado en la observación de caracteres morfológicos como el patrón de manchas alares, genitalia y caracteres observables en los palpos y antenas (8, 12, 13). Se utilizó la clave dicotómica del patrón alar descrita por Perruolo (18).

Con el fin de elaborar preparaciones microscópicas, los ejemplares de *Culicoides* se diseccionaron y las diferentes estructuras (alas, cabeza, tórax y abdomen) se colocaron en láminas porta objetos con medio EUPARAL y se observaron bajo la lupa binocular (OPTIKA, Zeiss) y la lupa binocular de mayor resolución Leica (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania).

La identificación molecular se efectuó mediante extracción de ADN genómico con estuche comercial QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) a partir de las patas y tórax de los *Culicoides* previamente identificados y la amplificación del gen COI con cebadores universales (19). Se evaluaron dos variantes de PCR (Variante 1 y 2). En la primera (Variante 1) la mezcla de reacción contenía un volumen final de 25 µL, con 2.5 µL de Buffer de reacción 10X, MgCl₂ 2mM, dNTPs 0,8 mM, cebador sentido y antisentido 0,2 µM, *Taq* DNA polimerasa 1 U/µL (Invitrogen, EE.UU.) y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen final (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C y 30 s a 72°C cada uno, con una extensión final de 7 min a 72°C. Se añadió un volumen de 1 µL de ADN genómico en la reacción de PCR y se incluyó un control negativo. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 2% y los productos de amplificación se visualizaron utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, EE.UU.). En la segunda variante (Variante 2) se realizaron algunos cambios en la concentración final de MgCl₂ (3 mM), se añadieron 1.5 µL en la mezcla de reacción y se añadieron 2 µL de ADN molde. Además, Se evaluaron dos programas de PCR, una Variante A: estándar, con una temperatura de alineamiento de 50°C y una Variante B: Touchdown, en la que todo fue similar a la Variante A, excepto en el programa donde se introducen 8 ciclos de 45°C- 49°C en la etapa del alineamiento.

Tabla 1. Granjas seleccionadas para las colecciones entomológicas de los *Culicoides*. / *Farms selected for entomological collections of Culicoides.*

Provincia	Municipio	Granja
Mayabeque	San José de las Lajas	Vaquería CENSA
	Catalina de Güines	Vaquería ICA
La Habana	Guanabacoa	Vista Hermosa

De las 18 muestras analizadas se identificaron dos especies, *Culicoides insignis* y *Culicoides hoffmani*, presentes en granjas bovinas de La Habana y Mayabeque. La identificación morfológica fue clara mediante el patrón de manchas alares. Se hicieron preparaciones microscópicas de 10 muestras representativas de cada granja.

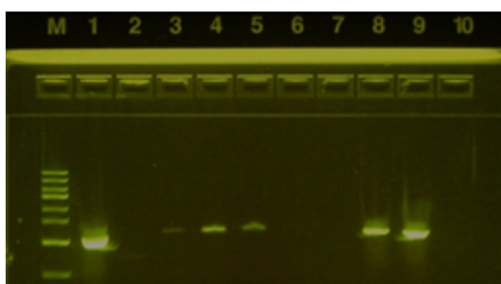
En la identificación molecular, los resultados de PCR de la Variante 1 no fueron significativos, solo se observó una banda muy poco definida en una muestra (2.3b, correspondiente al macerado de pata y tórax), el resto de las 17 muestras fueron negativas (datos no mostrados).

En la Variante 2 de PCR, se evaluaron las 18 muestras. En la **Figura 1** (Variante A y B) se muestra una representación de algunas de las muestras evaluadas. La Variante A mostró baja eficiencia, mientras que la Variante B (Touchdown) permitió amplificación exitosa en todas las muestras.

eficiente, permitiendo la amplificación exitosa del gen mitocondrial COI en todas las muestras evaluadas, mientras que la variante estándar fue poco eficiente. Este resultado es coherente con estudios previos (22, 23), que destacan la robustez del gen COI como marcador universal para la identificación específica mediante códigos de barras genéticos (24-27).

La presencia de *Culicoides insignis* en las granjas estudiadas reviste especial interés, dado su papel reconocido como vector del VLA en la región neotropical (13, 16, 28). Este hallazgo, en combinación con antecedentes serológicos de VLA en bovinos cubanos (29) y la reciente detección y caracterización molecular de doce serotipos del VLA presentes en bovinos y ovinos de la región occidental de Cuba (17), refuerza la necesidad de implementar sistemas de vigilancia entomológica y virológica que permitan

Variante A: Estándar



Variante B: Touchdown

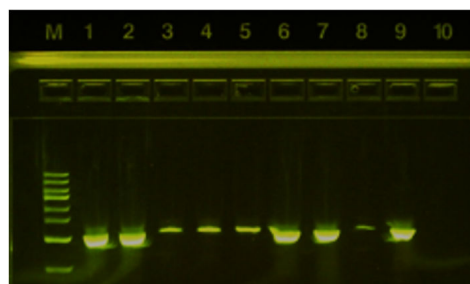


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con cebadores universales para la región COI. M: Marcador de 100 pb, Líneas 1: 2.3b Pata y Tórax; 2: 3.3a Pata y Tórax; 3: 2.1b Pata; 4: 2.1a Pata; 5: 2.2c Pata; 6: 2.2b Pata; 7: 2.2a Pata; 8: 3.3b Pata y Tórax; 9: Control Positivo (17 E002); 10: Control Negativo (agua libre de nucleasas). / Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified with universal primers for the COI region. M: 100 bp marker; Lines 1: 2.3b Leg and Thorax; 2: 3.3a Leg and Thorax; 3: 2.1b Leg; 4: 2.1a Leg; 5: 2.2c Leg; 6: 2.2b Leg; 7: 2.2a Leg; 8: 3.3b Leg and Thorax; 9: Positive Control (17 E002); 10: Negative Control (nuclease-free water).

La presente investigación constituye la primera evidencia morfológica y molecular en el estudio de los *Culicoides* asociados a la ganadería bovina en la región occidental de Cuba.

La identificación de dos especies, *Culicoides insignis* y *Culicoides hoffmani*, en las provincias de La Habana y Mayabeque representa un hallazgo relevante, ya que ambas especies han sido reportadas previamente en la literatura, pero no en el contexto de sistemas productivos bovinos cubanos ni mediante confirmación molecular.

La identificación morfológica basada en el patrón de manchas alares, siguiendo la clave de Perruolo (18), permitió discriminar con claridad ambas especies. Este resultado reafirma la utilidad de las claves taxonómicas tradicionales, especialmente cuando se aplican por personal entrenado y con acceso a equipos ópticos adecuados. No obstante, la similitud morfológica entre especies simpátricas del género *Culicoides* justifica plenamente el uso complementario de herramientas moleculares, como se planteó en esta investigación (20, 21).

En cuanto a la identificación molecular, la optimización de las condiciones de la PCR fue un paso crucial. La variante B del protocolo (Touchdown PCR) resultó ser la más

monitorear la circulación de éste y otros arbovirus de importancia veterinaria (30, 31).

En Cuba, la detección de *Culicoides paraensis* en áreas urbanas (32) confirma la necesidad de la vigilancia, no solo en escenarios productivos sino también de salud pública.

Por su parte, *Culicoides hoffmani*, aunque menos estudiado, ha sido reportado en otras regiones del Caribe y podría tener un papel vectorial aún no caracterizado, lo que subraya la importancia de su inclusión en estudios de competencia vectorial.

La detección de nuevas especies en Cuba y el Caribe (32, 33) confirma que la diversidad de *Culicoides* en la región está subestimada y requiere estudios continuos.

Este trabajo también demuestra la factibilidad de aplicar técnicas moleculares en condiciones locales, utilizando protocolos estandarizados y equipamiento accesible. Aunque las secuencias aún están pendientes de análisis, la obtención de productos amplificables constituye un avance metodológico significativo para futuras investigaciones.

La experiencia adquirida en este estudio sienta las bases para el desarrollo de capacidades nacionales en taxonomía molecular de vectores.

CONCLUSIONES

Se identifican morfológica y molecularmente *Culicoides insignis* y *Culicoides hoffmani* en granjas bovinas de La Habana y Mayabeque, lo que constituye el primer reporte de su presencia en zonas ganaderas de Cuba. Este hallazgo refuerza la necesidad de vigilancia entomológica y virológica en sistemas productivos del país.

REFERENCIAS

- Meiswinkel R, Elbers, AR. The dying of the light: crepuscular activity in *Culicoides* and impact on light trap efficacy at temperate latitudes. *Medical and Veterinary Entomology*. 2016; 30: 53-63.
- Kessinger P, James AM, Magzamen S, et al. Habitat suitability analysis for *Culicoides* species implicated in bluetongue virus transmission in the Southeastern United States. *Med Vet Entomol*. 2024;38(4):e12786. doi: <http://doi.org/10.1111/mve.12786>.
- Hunter P. Climate change and waterborne and vector-borne disease. *J Appl Microbiol*. 2003; 94: 37-46.
- MacLachlan NJ, Mayo CE. Potential strategies for control of bluetongue, a globally emerging *Culicoides*-transmitted viral disease of ruminant livestock and wildlife. *Antivir. Res*. 2013; 99:79-90.
- Al-Malki ES. The impacts of climate change on the global range of *Culicoides punctatus* with notes on its status in Saudi Arabia. *PeerJ*. 2025;13:e18916. doi: <http://doi.org/10.7717/peerj.18916>.
- Catania AM, Grego E, Tomassone L, et al. Silent circulation of Bluetongue and Schmallenberg viruses in *Culicoides* biting midges in northwestern Italy: implications for the 2024 BTV outbreak. *J Med Entomol*. 2025;62(6):1582-9. doi: <http://doi.org/10.1093/jme/tjaf128>.
- García I. Insectos hematófagos de Cuba. *Poeyana*. 1976; 154: 1-20.
- Wirth WW, FS Blanton. Biting midges of the genus *Culicoides* from Panama (Diptera, Heleidae). *Proc. U.S. Nat. Mus*. 1959; (3415),109:237-482.
- Wirth WW, Blanton FS. Studies in Panama *Culicoides* (Diptera, Heleidae) III. A new species related to *phlebotomus* (Williston). *Entomological News*. 1953; 64: 113-120.
- Fox I. A review of the species of biting midges of *Culicoides* from the Caribbean Region (Diptera: Ceratopogonidae). *Ann. Ent. Soc. Amer*. 1946; 39: 248-258.
- Lutz A. Contribuicao para o estudo das Ceratopogoninas hematofagas do Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1913; 5: 45-73.
- Spinelli GR, Ronderos MM, Díaz F, Marino P. The bloodsucking biting midges of Argentina (Diptera: Ceratopogonidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005; 100: 137-150.
- Borkent A, Spinelli GR. Biodiversidad Acuática en América Latina. Neotropical Ceratopogonidae (Diptera: Insecta). 2007; 4: 1-200.
- Stephan A, Clausen PH, Bauer B, Steuber S. PCR identification of *Culicoides dewulfi* midges (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of bluetongue in Germany. *Parasitology Research*. 2009; 105:367-371.
- Zhang S, Chen Z, Xiao L, Wang J. Development of a nested PCR assay-based molecular identification and genetic analysis of common *Culicoides* species in Fujian Province. *Chin J Parasitol Parasit Dis*. 2025;43(3):403-8. doi: <http://doi.org/10.12140/j.issn.1000-7423.2025.03.015>.
- Mosquera JD, Zapata S, Augot D. *Culicoides insignis* in Ecuador: Molecular identification of blood meals and detection of bluetongue virus. *Curr Res Parasitol Vector Borne Dis*. 2025;8:100288. doi: <http://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2025.100288>.
- Acevedo AM, Postic L, Curiel M, Gondard M, Bréard E et.al. Detection, Characterization and Sequencing of BTV Serotypes Circulating in Cuba in 2022. *Viruses*. 2024; 16: 164. doi: <https://doi.org/10.3390/v16010164>.
- Perruolo G. Clave de las especies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) asociadas con la ganadería en la región neotropical. *Rev Cient FCV-LUZ*. 2009;19(2):124-33.
- Simon CF, Frati A, Beckenbach B, Crespi H, Lui, P Flook. Evolution, weighing and phylogenetic unity of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am*. 1994; 87: 651-701.
- Dähn O, Werner D, Mathieu B, Kampen H. Large Scale Cytochrome C Oxidase Subunit I Gene Data Analysis for the Development of a Multiplex PCR Test Capable of Identifying Biting Midge Vector Species and Haplotypes (Diptera: Ceratopogonidae of the *Culicoides* Subgenus *Avaritia* Fox, 1955. *Genes*. 2024; 15(3):323. doi: <http://doi.org/10.3390/genes15030323>.
- Sena da Silva SL, Sena do Nascimento BL, da Silva FS, Damous Diaz D, Da Silva, LH, et al. Diversity and molecular identification of *Culicoides Latreille 1809* in a mining complex in the southeastern region of the Brazilian Amazon. *Acta Tropica*. 2026; 278:108060. doi: <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2026.108060>.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball y De Waard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*. 2003;270: 313-21.
- Ander M, Troell K, Chirico J. Barcoding of biting midges in the genus *Culicoides*: a tool for species determination. *Medical and Veterinary Entomology*. 2012; 27(3): 323-331.
- Jin T, Husseneder C, Foil L. Assigning *Culicoides* larvae to species using DNA barcoding of adult females and phylogenetic associations. *Parasit Vectors*. 2022;15:349. doi: <http://doi.org/10.1186/s13071-022-05479-1>.
- Farias J, et al COI barcodes for the identification of anthropophilic biting midges from the Brazilian Amazon. *Eur J Entomol*. 2025; 122:88-98.
- Dähn O, Werner D, Mathieu B, Kampen H. Development of conventional multiplex PCR assays for identification of 21 West Palaearctic *Culicoides* tax. *Diversity* 2023; 15 (6):699. doi: <http://doi.org/10.3390/d15060699>.

27. Springer Nature. Chromosome-scale genome of *Culicoides brevitarsis* provides a resource for vector biology. *BMC Genomics*. 2023; 24:112.
28. Tanya VN, Greiner EC, Gibbs EPJ. Evaluation of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus. *Veterinary microbiology*. 1992; 32(1): 1-14.
29. Martínez N, Alfonso A, Barrera M. Primer reporte de bovinos seroreactores al virus de la lengua azul en Cuba. *Rev. Salud Anim*. 2011; 33: 131-133.
30. Thabet S, Lajnef RR. Potential mechanisms underlying bluetongue virus emergence and spread. *Front Virol*. 2024; 4:1448192. doi: <http://doi.org/10.3389/fviro.2024.1448192>.
31. McGregor BL, McDermott EG. Advancing knowledge on *Culicoides* biting midges, vectors of medical and veterinary importance. *J Med Entomol*. 2026;63(2):tjag044. doi: <http://doi.org/10.1093/jme/tjag044>.
32. Martínez Pérez Y, Companioni Ibáñez A, Menéndez Z, *et al*. First report of *Culicoides paraensis* in Cuba: A new challenge for public health. *Parasite Epidemiol Control*. 2025; 29:e00423. doi: <http://doi.org/10.1016/j.parepi.2025.e00423>.
33. Holcomb KM, Dunford JC, Connelly CR. Estimated suitability distribution for *Culicoides paraensis* in the contiguous United States and Caribbean territories. *J Med Entomol*. 2026; 63(2):tjag038. doi: <http://doi.org/10.1093/jme/tjag038>.