

Detecció d'arbovirus en vectors a Espanya



Tesi Doctoral
Carlos Aranda Pallero

Departament de Sanitat i Anatomia Animals
Facultat de Veterinària
Bellaterra, 2010

Detecció d'arbovirus en vectors a Espanya

Memòria presentada per
Carlos Aranda Pallero

Per optar al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció del
Dr. Joaquim Castellà i Espuny

Universitat Autònoma de Barcelona
Programa de Medicina Veterinària
Departament de Sanitat i Anatomia Animals
Facultat de Veterinària
Bellaterra, 2010

...Tot té el seu moment,
sota el cel hi ha un temps
per a cada cosa.
Hi ha un temps d'infantar
i un temps de morir,
un temps de plantar
i un temps de collir...

Cohèlet, 3: 1-8

Agraïments:
A l'Adriana, a la meva família, al Joaquim, a la xarxa EVITAR, a l'SCM del Consell Comarcal del Baix
Llobregat i als altres tres SCM. Al Consell Comarcal. A tots els que han participat en aquest
projecte, a tota la gent que m'ha ajudat.

ÍNDIX

Resum	1
Abstract	2
Preàmbul	3
Objectius	4
Introducció	5
Arbovirus	5
Cicle vital dels arbovirus	5
El virus del Nil occidental (VNO)	8
Els vectors: culícids	10
Els vectors: flebòtoms	16
Metodologia entomològica: recollida de mostres i tipus de captura	17
Localització de les trapes	17
Articles publicats	19
Article 1. First record and establishment of the mosquito <i>Aedes albopictus</i> in Spain	21
Article 2. Usutu Virus Sequences in <i>Culex pipiens</i> (Diptera: Culicidae), Spain	27
Article 3. Detection and Monitoring of Mosquito Flaviviruses in Spain between 2001 and 2005	33
Article 4. Surveillance of Arboviruses in Spanish Wetlands: Detection of New Flavi- and Phleboviruses	43
Resum de resultats i de discussió	49
Detecció del mosquit tigre (<i>Aedes albopictus</i>)	49
Culícids	49
Flebòtoms	53
<i>Flavivirus</i> i <i>Phlebovirus</i>	53
Detecció del virus Usutu (USUV)	55
Conclusions	57
Annex: Resultats obtinguts en flebòtoms entre 2002 i 2005 a totes les àrees	59
Bibliografia	61

RESUM

Entre els anys 2001 i 2005 es van capturar i analitzar 72.895 femelles de mosquits (Diptera: Culicidae) i 6.871 de flebòtoms (Diptera: Psychodidae) en les estacions d'abundància amb l'objectiu de detectar la presència de genoma d'arbovirus en diferents àrees d'Espanya, en especial en zones humides. L'estudi forma part d'un de més general que tracta de la transmissió d'arbovirus en quatre dels aiguamolls més importants d'Espanya que es troben a Girona, Barcelona, Tarragona i Huelva.

Els insectes es van recollir amb esquer humà, amb trampes de CO₂ i amb trampes CDC i es van agrupar en pools segons la data de captura, la localitat i l'espècie. Pel que fa als flebòtoms, les mostres es van obtenir a partir del 2002 a Barcelona i Huelva i es van identificar com a subfamília. Els culícids es van agrupar en 4.723 pools i pertanyien a 20 espècies dels gèneres *Anopheles*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Culex*, *Culiseta*, *Coquillettidia* i *Uranotaenia* i els flebòtoms es van agrupar en 236 pools com a tals.

Mentre es duia a terme l'estudi, es va detectar el mosquit invasor -*Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse)- per primera vegada a Espanya, concretament a Sant Cugat del Vallès, durant l'estiu del 2004. Mitjançant inspeccions immediatament posteriors es va comprovar l'existència d'importantes poblacions a la zona, i se'n va confirmar l'establiment. Aquesta és la primera notificació de l'espècie esmentada a la península Ibèrica. Es van analitzar totes les femelles capturades posteriorment a l'àrea d'estudi.

L'espècie de culícid més abundant va ser *Ochlerotatus caspius* (40,9 %), seguida de *Culex pipiens* (32,3 %), *Culex theileri* (10,9 %), *Anopheles atroparvus* (6,6 %), i *Culex modestus* (4,6 %).

Es van analitzar homogenats dels vectors per detectar directament ARN d'arbovirus dels gèneres *Alphavirus*, *Flavivirus* i *Phlebovirus*. No s'ha trobat ARN d'arbovirus patògens coneguts. En el cas dels mosquits, 111 pools van ser positius a *Flavivirus*, l'únic gènere detectat en aquest grup taxonòmic. Les seqüències de *Flavivirus* identificades són diferents de qualsevol *Flavivirus* de mosquit conegut i majoritàriament properes al virus *Kamiti River* (KRV) o al virus *cell fusing agent* (CFA), excepte en dos pools d'Andalusia que es troben properes al grup de virus transmesos per artròpodes. Per a totes les zones i espècies, es va calcular l'estimació del màxim de versemblança de la taxa d'infecció o *the maximum likelihood estimation infection rate* (MLE). *Ae. albopictus* tingué la MLE més alta, de 47,14, seguida per *Aedes vexans* amb 43,67 en el conjunt de l'àrea d'estudi. Per sota d'aquestes espècies hi havia *Culiseta annulata*, amb 36,00. Les espècies més abundants, *Oc. caspius* i *Cx. pipiens*, va obtenir valors MLE baixos (0,94 i 0,38 respectivament) en el conjunt de tota l'àrea.

En el cas dels flebòtoms, 10 pools (9 dels quals de Barcelona) van donar positiu a *Flavivirus* semblants a *Culex Flavivirus* (CxFV). És la primera vegada que es troba genoma d'aquest gènere en flebòtoms de fora de l'Àfrica. En 8 pools de Barcelona es va trobar un *Phlebovirus* similar al complex Nàpols i al virus Massília.

Cal assenyalar que en el cas d'alguns mosquits, en especial en mostres dels gèneres *Aedes* i *Ochlerotatus*, el genoma detectat probablement eren seqüències d'ADN integrades en el genoma dels mosquits. Aquest fet l'han observat recentment altres autors.

El 2006, seguint amb la campanya de detecció d'arbovirus, es va trobar, entre 436 pools dels aiguamolls de Catalunya i 9 espècies de mosquit, un de positiu a un *Flavivirus* identificat com a virus Usutu (USUV) en un pool de 3 *Cx. pipiens* obtingut a Viladecans (Barcelona). Les dades d'homologia van mostrar que la soca espanyola pertanyia a l'USUV però que era més propera a mostres africanes d'USUV que a les obtingudes a Europa central.

ABSTRACT

With the aim of assessing the presence of arbovirus genome in vectors in different areas, especially wetlands, in Spain, a total of 72,895 female mosquitoes (Diptera: Culicidae) and 6,871 sandflies (Diptera: Psychodidae) were trapped during their season of abundance, and analyzed between the years 2001 and 2005. The study formed part of general arbovirus transmission research in four of the most important wetlands in Spain in the provinces of Girona, Barcelona, Tarragona, and Huelva.

Insects were collected using human bait, CO₂ traps, or light traps, and they were pooled according to date of collection, location, and species. In the case of sandflies, the period of study started in 2002 in Barcelona and Huelva and species were not identified. Mosquitoes were sorted into 4,723 pools belonging to 20 Culicidae species from the *Anopheles*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Culex*, *Culiseta*, *Coquillettidia*, and *Uranotaenia* genera. Sandflies were sorted into 236 pools as a whole.

During the study, the invasive mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) was detected for the first time in Spain, in Sant Cugat del Vallès during August 2004. Dense populations of adults and larvae were found in subsequent surveys, confirming the establishment of this species in this area. This is the first report of the establishment of *Ae. albopictus* in the Iberian Peninsula. All captured females in the studied area belonging to this species were analyzed.

The most abundant species was *Ochlerotatus caspius* (40.9 %), followed by *Culex pipiens* (32.3 %), *Culex theileri* (10.9 %), *Anopheles atroparvus* (6.6 %), and *Culex modestus* (4.6 %).

Arboviral RNA was directly detected from vector homogenates for the genera *Alphavirus*, *Flavivirus*, and *Phlebovirus*. No arboviral RNA from known pathogenic arboviruses was found. In the case of mosquitoes, 111 pools tested positive for unknown mosquito *Flavivirus*, the only genus detected in this taxonomic group. The *Flavivirus* sequences identified were different from all known *Flavivirus* mosquito viruses, but very close to Kamiti River virus (KRV) or cell fusing agent virus (CFA) with the exception of two pools from Andalusia, close to the group of arthropod borne viruses. The maximum likelihood estimation infection rate (MLE) was calculated for all regions and species. *Ae. albopictus* had the highest MLE at 47.14, followed by *Aedes vexans* with 43.67 over the entire area. These species were followed by *Culiseta annulata*, with 36.00. The most common species, *Oc. caspius* and *Cx. pipiens*, had low MLE values -0.94 and 0.38, respectively- over the area as a whole.

In the case of sandflies, 10 pools (9 in Barcelona) tested positive for a *Flavivirus* similar to *Culex Flavivirus* (CxFV) being this, the first time that *Flavivirus* genome is detected in sand flies outside Africa. *Phlebovirus* viruses similar to Naples complex and Massilia were found in 8 sandflies pools, all from Barcelona area.

In some samples of mosquitoes, especially in genera *Aedes* and *Ochlerotatus*, detected genome was probably DNA sequences integrated in the mosquito genome as has been observed recently by other authors.

In 2006, surveillance monitoring samples carried out in Catalonia detected, in 436 pools belonging to 9 mosquito species, a positive for *Flavivirus* identified as Usutu virus (USUV) in a pool of 3 *Cx. pipiens* obtained from the town of Viladecans, Barcelona. The homology data showed that the Spanish strain belongs to USUV species and is more related to the African USUV isolates than to central European isolates.

PREÀMBUL

En aquesta tesi per compendi d'articles es presenta en ordre cronològic de publicació i en quatre treballs, l'estudi dut a terme a Espanya entre els anys 2001 i 2005 sobre la detecció d'arbovirus en artròpodes hematòfags, majoritàriament mosquits (Diptera: Culicidae) però que també incorpora dades relatives a flebotòms (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) des del 2002. També s'inclou un article sobre la detecció d'un culícid positiu a una soca de l'USUV a Catalunya l'any 2006 obtingut durant les campanyes de vigilància posteriors al període estudiat inicialment. El primer dels articles presentats és a més, la publicació de la primera detecció de l'espècie de culícid *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) a la península Ibèrica feta per l'autor mateix. Es recullen també per primera vegada al nostre país mostres d'aquesta espècie per a l'estudi dels arbovirus.

En aquesta tesi han participat l'Institut de Salut Carlos III del Consell Superior d'Investigacions Científiques a Madrid (ISCIII), el Centre de Recerca en Salut Animal (CReSA) de la UAB de Bellaterra, els tres serveis de control de mosquits de Catalunya (SCM) i l'SCM de la Diputació de Huelva a Andalusia, tots dependents d'administracions públiques locals.

Des de l'SCM del Consell Comarcal del Baix Llobregat es va proposar el disseny de la campanya entomològica i es va dur el gruix de l'elaboració de l'estudi que ara es presenta.

Aquesta tesi forma part d'un treball molt ampli en el qual han participat 29 institucions i més d'un centenar d'investigadors que van formar part de la xarxa d'investigació espanyola EVITAR, *Red de Investigación en Enfermedades Víricas transmitidas por Artrópodos y Roedores* entre els anys 2001 i 2005.

En aquesta xarxa es van estudiar tant mostres d'artròpodes com de rosegadors, d'aus salvatges, de cavalls i d'humans sobre les quals posteriorment s'han fet diverses publicacions (Sanbonmatsu-Gámez et al, 2005, Sánchez-Seco i Navarro, 2005, Sánchez-Seco et al, 2005, Bofill et al, 2006, Domingo, et al, 2007, Figuerola et al, 2007a, Figuerola et al, 2007b, Figuerola et al, 2008, Figuerola et al, 2009, Kaptoul et al, 2007, López et al, 2008, Alcaide et al, 2009) i que han servit de nucli de posteriors recerques sobre arbovirus. Els autors dels articles que s'inclouen en aquesta tesi són especialistes en diversos camps com la virologia, l'entomologia, l'epidemiologia i la sanitat humana i animal. En el cas de l'autor de la tesi, el seu camp de treball s'ha centrat en l'entomologia i en el paper dels insectes objecte de l'estudi com a vectors.

La recollida de mostres es va iniciar el 2001 i hi van participar l'SCM de la badia de Roses i el Baix Ter, l'SCM del Consell Comarcal del Baix Llobregat i el Consorci Agroambiental de les Terres de l'Ebre (CODE) com a totalitat dels serveis de control de mosquits catalans encarregats de l'obtenció periòdica de les mostres, i l'ISCIII com a encarregat de l'anàlisi i de la detecció de seqüències d'arbovirus en les mostres. El 2002 es va incorporar l'SCM de la Diputació de Huelva en la recollida de mostres d'aquesta zona i el 2005, el CReSA, que va passar a analitzar les mostres de Catalunya de manera que l'ISCIII només es va quedar a càrrec de les mostres andaluses. Prèviament, l'ISCIII havia transferit la tecnologia necessària perquè el CReSA dugués a terme l'anàlisi virològica de les mostres catalanes, de manera que el resultat final fos homogeni al que s'estava obtenint amb la participació de l'ISCIII. Cal tenir en compte aquesta incorporació i el relleu d'organismes participants en els resultats dels articles presentats, ja que en els articles tercer i quart, el període i les zones estudiades varien i com a conseqüència també canvien els resultats numèrics.

La major part del treball s'ha centrat en l'anàlisi dels culícids de les quatre zones i dels flebotòms capturats al Baix Llobregat i a Huelva, tot i que la majoria es van obtenir a la comarca catalana. En els altres dos SCM catalans no es va obtenir cap mostra de flebotòms.

OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquesta tesi i dels treballs que es reflecteixen en els articles que s'hi presenten, ha estat detectar la presència d'arbovirus en vectors a Espanya per comprovar la circulació d'arbovirus coneguts, en especial el virus del Nil occidental (VNO), o bé de nous i poder així iniciar la vigilància d'aquests patògens i dels seus vectors.

En concret els objectius han estat els següents:

Detectar i identificar la presència de genoma d'arbovirus en culícids i flebòtoms de les mostres recollides en les diverses localitats de les quatre zones estudiades.

Conèixer la composició de la població de culícids estudiada i les espècies implicades en la transmissió d'arbovirus.

INTRODUCCIÓ

Arbovirus

Els arbovirus són virus ARN transmesos usualment a vertebrats per artròpodes. Reben aquest nom per l'acrònim derivat de l'anglès *ARthropod BORne VIRUS*. Els arbovirus es multipliquen tant en els hostes vertebrats com en els seus vectors, per tant, abasten únicament els virus transmesos biològicament. Se n'exclouen, doncs, els virus transmesos per contacte.

La presència d'arbovirus és un factor d'importància tant en la introducció de malalties emergents com en la transmissió de malalties poc usuals a la nostra àrea geogràfica. No obstant això, a Espanya hi ha pocs estudis fets fins al començament d'aquest segle. Cal tenir en compte que la península Ibèrica és una àrea molt diversa des del punt de vista geogràfic i climàtic i que hi ha ecosistemes complexos en els quals poden interactuar els diferents elements que incideixen en la transmissió de malalties causades per arbovirus. És a més, una de les vies d'entrada d'aus migradores que poden introduir al seu torn arbovirus i altres patògens adquirits fora del nostre país.

Els darrers anys hi ha hagut informes de l'emergència o reemergència de l'activitat d'arbovirus: el VNO a Amèrica i Europa, l'USUV a l'Àfrica i a Europa, el Rift Valley virus (RVFV) a la península Aràbiga i el Chikungunya virus (CHIKV) a l'Índia i a l'Illa de la Reunió (Roehrig et al, 2002, Shoemaker et al, 2002, Weissenbock, et al, 2002, Zeller and Shuffenecker, 2004, Esteves et al, 2005, Saxena et al, 2006, Staikowsky et al, 2006). Encara més recent i al nostre entorn, a Itàlia hi va haver un brot del CHIKV el 2007 (Angelini et al, 2007). En àrees diverses de la conca de la Mediterrània, es detecten de manera continuada brots del VNO que han afectat cavalls i humans (Murgue et al, 2001, Del Giudice et al, 2004, Schuffenecker, et al, 2005, Takken i Knols, 2007, Savini et al, 2008). A Espanya hi ha evidència d'anticossos del VNO i d'altres *Flavivirus* que poden afectar humans en diverses zones (Lozano i Filipe, 1998, Vallés i Sánchez, 2000).

Darrerament hi ha hagut evidència d'infecció del VNO en sèrum humà en haver-se detectat IgM i IgG. Igualment s'ha descrit el primer cas amb afectacions neurològiques en humans a Espanya causades pel VNO (Bofill et al, 2006, Bernabeu-Wittel et al, 2007, Kaptoul et al, 2007). També s'han detectat anticossos davant del VNO en diverses espècies d'aus d'aiguamolls espanyols (Figuerola et al, 2007a, Figuerola et al, 2008) i s'ha aïllat el virus en aus (Jiménez-Clavero et al, 2008, Sotelo et al, 2009). S'han detectat anticossos en èquids i bòvids (Jiménez-Clavero et al, 2007) i un nou llinatge del VNO, ha estat detectada també en mosquits (Vázquez et al, 2010).

Cicle vital dels arbovirus

Els arbovirus són diversos taxonòmicament i s'agrupen en diferents famílies i 14 gèneres (Gubler, 2002). Els arbovirus principals es distribueixen entre les famílies Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae i Rhabdoviridae. Probablement *Alphavirus*, *Flavivirus* i *Phlebovirus* són tres dels gèneres més importants en medicina i veterinària.

Tot seguit s'exposa un resum amb les principals famílies i gèneres de les malalties més conegudes causades per arbovirus i pels seus vectors, adaptat d'Eldridge i Edman, 2000:

TOGAVIRIDAE

<i>Alphavirus</i>	Vectors (gèneres)
Encefalitis equina de l'est (EEE)	<i>Culex, Aedes</i>
Encefalitis equina de l'oest (WEE)	<i>Culex, Aedes</i>
Highlands J (HJ)	<i>Culiseta</i>

Introducció

Encefalitis equina veneçolana (VEE)	<i>Culex, Aedes</i>
Chikungunya (CHIK)	<i>Aedes</i>
O'nyong-nyong (ONN)	<i>Anopheles</i>
Ross River (RR)	<i>Culex, Aedes, Anopheles</i>
Sindbis (SIN)	<i>Culex</i>
Bosc Semliki (SF)	<i>Culex, Aedes</i>
Bosc Barmah (BF)	<i>Culex, Aedes, Coquillettidia</i>

FLAVIVIRIDAE

<i>Flavivirus</i>	Vectors (gèneres)
Rocio (ROC)	<i>Aedes, Psorophora</i>
Wesselsborn (WSL)	<i>Aedes, Mansonia, Anopheles</i>
Febre groga (YF)	<i>Aedes, Haemagogus</i>
Encefalitis de Sant Louis (SLE)	<i>Culex</i>
Encefalitis japonesa (JE)	<i>Culex</i>
Encefalitis de Murray Valley (MVE)	<i>Culex</i>
Del Nil occidental (VNO)	<i>Culex, Aedes, Anopheles</i>
Dengue (DEN)	<i>Aedes</i>
Usutu (US)	<i>Culex</i>
Encefalitis russa (RSSE)	<i>Ixodes</i>
Encefalitis ovina (LI)	<i>Ixodes</i>
Powassan (POW)	<i>Ixodes, Dermacentor</i>

BUNYAVIRIDAE

<i>Bunyavirus</i>	Vectors (gèneres)
Bunyamwera (BUN)	<i>Aedes, Mansonia, Culex</i>
Cache Valley (CV)	<i>Aedes, Psorophora, Anopheles</i>
Northway (NOR)	<i>Ochlerotatus, Anopheles</i>
Encefalitis californiana (CE)	<i>Aedes</i>
Jamestown Canyon (JC)	<i>Aedes, Culiseta</i>
LaCrosse (LAC)	<i>Aedes</i>
Snowshoe hare (SSH)	<i>Ochlerotatus</i>
Tahyna (TAH)	<i>Aedes, Culex</i>
Trivittatus (TVT)	<i>Aedes</i>
Oropuche (ORO)	<i>Culicoides</i>
<i>Nairovirus</i>	Vectors (gèneres)
Febre de Crimea Congo (CCHF)	<i>Hyalomma</i>
<i>Phlebovirus</i>	Vectors (gèneres)
Febre Rift Valley (RVF)	<i>Aedes, Culex, Culicoides ?</i>
Febre dels flebotoms, Toscana (SFF)	<i>Phlebotomus</i>

REOVIRIDAE

<i>Orbivirus</i>	Vectors (gèneres)
Llengua blava (BLU)	<i>Culicoides</i>

Pesta equina (AHS)	<i>Culicoides</i>
Malaltia epizoòtica hemorràgica (EHD)	<i>Culicoides</i>
Encefalitis equina (EE)	<i>Culicoides</i>
Palyam (PAL)	<i>Culicoides</i>

RHABDOVIRIDAE

<u><i>Vesiculovirus</i></u>	<u>Vectors (gèneres)</u>
Estomatitis vesicular (VS)	<i>Lutzomyia, Culicoides</i>
<u><i>Ephemerovirus</i></u>	<u>Vectors (gèneres)</u>
Febre efímera bovina (BEF)	<i>Aedes, Culex, Culicoides</i>

El cicle natural dels arbovirus implica habitualment un artròpode hematòfag i un hoste vertebrat. Generalment el virus es transmet al vector en ingerir aquest sang d'un hoste infectat. Després de la multiplicació del virus al vector, hi ha una migració a les glàndules salivals i el vector ja és capaç de transmetre el patogen a un altre animal en el cas que torni a picar per obtenir la sang. A l'hoste, habitualment un vertebrat, el virus es multiplica i es torna infectiu, i pot transmetre el patogen a un vector de manera que es tanqui el cicle. El període d'incubació en el vector s'anomena extrínsec i en el vertebrat, intrínsec. Contínuament es coneixen nous arbovirus, tot i així es pot considerar que hi ha 534 virus registrats en el catàleg internacional d'arbovirus (Karabatsos, 1985). D'aquests, 214 s'identifiquen com a tals o bé són arbovirus probables; 287 es consideren possibles arbovirus, i 33 es presenten com probablement o definitivament no arbovirus. Dels 534, 134 s'han documentat com a causants de malalties en humans.

El cicle de transmissió no és únic i afecta sempre a vertebrats, en especial mamífers i aus. Donat que els vectors tenen apetències específiques pel que fa a la seva hematofàgia, es compren fàcilment que en cada cas, el cicle de la malaltia estarà lligat als hostes infectats pels seus vectors específics.

Molts vectors tenen comportaments hematòfags variables segons les condicions ecològiques en que es desenvolupen com per exemple algunes espècies de culícids del gènere *Culex* que piquen especialment aus com és el cas dels mosquits implicats en la transmissió del VNO.

Entre las malalties causades per arbovirus cal destacar el Dengue en les seves varietats i en especial en la hemorràgica, la Febre Grogga, la Febre Rift Valley i diverses encefalitis en humans i la Pesta equina y la Llengua Blava en ramats. El brot de Chikungunya el 2007 a Itàlia és un fet important a Europa en produir-se la transmissió d'un virus exòtic mai abans present en aquesta zona del mon.

Diferents arbovirus de patogenicitat incerta han estat descrits també en mosquits sense un hoste vertebrat conegut. Dins del gènere *Flavivirus* es troben el *cell fusing agent virus* (CFA) detectat per primera vegada el 1975 en una línia cel·lular d'*Aedes aegypti* i el virus Kamiti River (KRV) trobat a mostres de mosquits en aquesta zona de Kenia (Stollar i Thomas, 1975, Crabtree et al, 2003, Sang et al, 2003). Poc és el que es coneix sobre ells fora de que tenen capacitat d'infectar únicament mosquits (Cammisa-Parks et al, 1992). Val a dir però que tot recentment s'ha observat tant a la natura com en línies cel·lulars com tot indica que genoma d'aquests tipus de virus es troba en el genoma dels mosquits en forma d'ADN, (Crochu et al, 2004, Vázquez, 2008, Roiz et al, 2009).

Investigacions recents han detectat una nova soca del virus CFA anomenada Culebra en mosquits dels gèneres *Aedes* i *Culex* a Puerto Rico (Cook et al, 2006), i un altre nou virus al Japó en *Cx. pipiens* anomenat *Culex Flavivirus* (CxFV) (Hoshino et al, 2007).

El virus del Nil occidental (VNO)

Si prenem com a referència el cicle del VNO, un dels arbovirus amb una distribució temporal i geogràfica més àmplia al nostre entorn mediterrani i europeu, es pot comprovar que, pertany al gènere *Flavivirus* (família *Flaviviridae*) i en concret, al complex antigènic de l'encefalitis japonesa (Figs. 1 i 2).

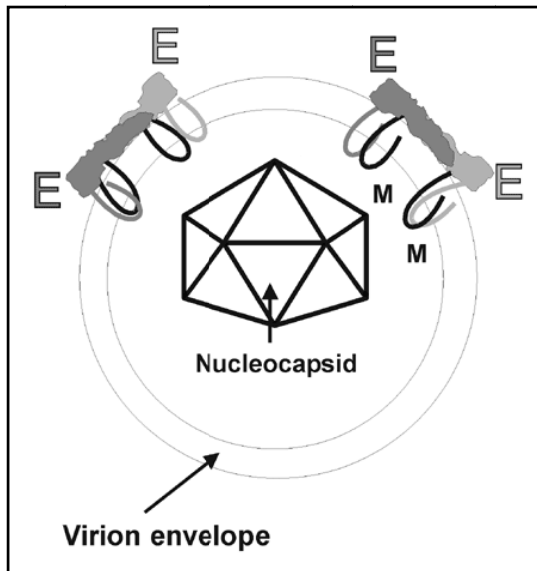


Figura 1. Esquema del virus del Nil occidental. Adaptat de CDC.

Els virions de la família *Flaviviridae* contenen el genoma viral, un RNA monocatenari, no segmentat, de polaritat positiva, envoltat d'una nucleocàpsida de simetria polièdrica de 25-35 nm que, al seu torn, es troba envoltada d'una cobertura derivada de la membrana de la cèl·lula hoste, de manera que configura una partícula esfèrica o pleomòrfica de 40-60 nm de diàmetre amb petites espícules procedents de la glicoproteïna viral.

Els *Flavivirus* infecten durant el seu cicle vital hostes vertebrats i artròpodes (mosquits o paparres), en els quals es multipliquen. Generalment, la transmissió es produeix per picadura d'un artròpode infectat. Tots els membres del grup antigènic del virus de l'encefalitis japonesa es transmeten per mosquits que provoquen accessos febrils en el

vertebrat infectat que poden evolucionar a manifestacions clíniques greus i a la mort. Tant en humans com en equins, les infeccions poden associar-se a encefalitis o encefalomielitis i mort. La infecció en aus domèstiques i salvatges pot conduir igualment a la mort de l'exemplar infectat.

El VNO es va aïllar per primera vegada d'una dona malalta del districte West Nile a Uganda el 1937. D'aquí se'n deriva el seu nom. En català s'ha decidit usar la traducció del nom del districte, malgrat que és un nom propi. Durant els anys cinquanta es va aïllar en humans, aus i mosquits a Egipte. Ràpidament es va veure que era un dels *Flavivirus* més estesos a l'Àfrica i Euràsia (Hubálek i Halouzka, 1999).

Les darreres dècades ha reaparegut en zones temperades d'Europa com França o Romania, i s'ha detectat també a Espanya, tal com s'ha explicat anteriorment. El 1999 es va trobar per primera vegada al continent americà on constitueix un risc seriós per a la sanitat humana i animal (Anderson et al, 1999, Trock et al, 2001).

Actualment l'OMS considera el VNO un virus emergent a l'Amèrica del Nord des del 1999 i reemergent a Europa des del 1996.

El cicle biològic comporta un hoste no humà, aus principalment, i un artròpode (mosquit, paparra)

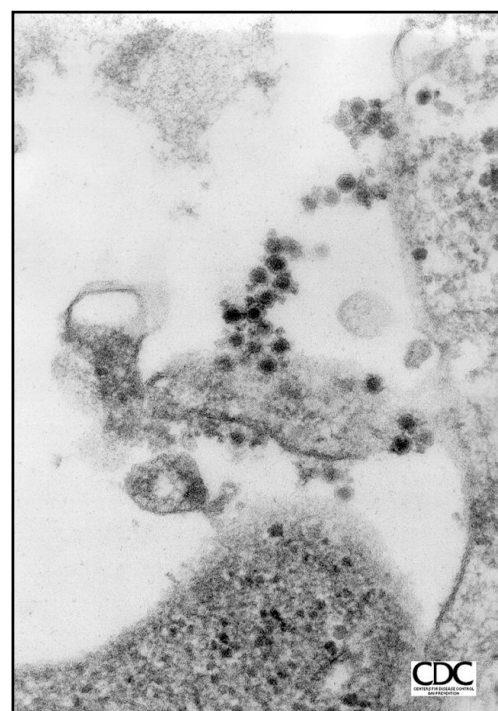


Figura 2. Virus VNO en teixit cerebral de corb. Adaptat de CDC. Imatge: B. Cropp, DVVID.

com a vector primari. La majoria de vegades, el cicle del vector es completa únicament en les aus i no es detecta fins que els humans entren en contacte amb el cicle natural o el virus escapa d'aquest cicle amb un vector secundari o hoste vertebrat a causa d'algun canvi ecològic. En aquest cas afecta principalment cavalls o humans (Fig. 3).

El virus és present en les glàndules salivals e infecta les aus durant l'alimentació de les femelles de mosquit. Es multiplica entre 1 i 4 dies després a la picadura i es desenvolupa la immunitat en les aus. El virus persisteix en l'organisme d'aquestes entre 20 i 200 dies. Si es troba un nombre suficient de mosquits, aquests mantenen el cicle extrínsec durant unes 2 setmanes i per tant es pot tornar a infectar un altre hoste.

Humans, cavalls i la majoria de mamífers no presenten elevades virèmies de manera habitual, de manera que normalment no permet de mantenir el cicle fora del que comporta amb l'au com a hoste. En aquests casos, el virus sols es troba en sang uns 3-6 dies, fet que impedeix que fora d'aquest període el cicle es pugui mantenir gràcies a aquests hostes intermediaris, ja que la picadura ocasional d'un mosquit no obtindrà sang infectada.

Fora d'humans i cavalls, el virus s'ha aïllat de manera esporàdica d'altres mamífers, com diverses espècies de ratolins, hámsters, conills, camells, gossos o lèmurs. També s'ha trobar en granotes i caimans.

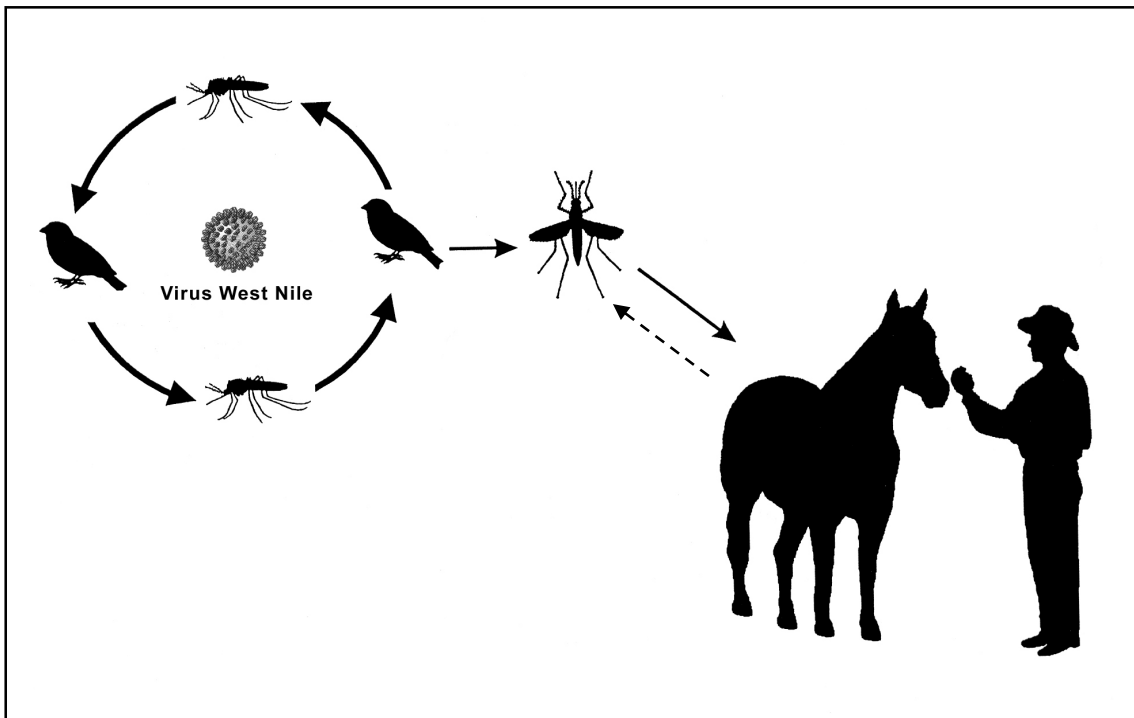


Figura 3. Cicle del VNO. Adaptat d'Eldridge i Edman.

El VNO veu amplificat el seu cicle vital durant el període en què es produeix el cicle vital dels mosquits amb alimentació dels adults amb sang. Per tant queda comprès, en la major part de l'hemisferi Nord, entre abril i octubre. Se suposa, a més, que les aus migradores poden fer que el virus es dispersi en desplaçar-se dintre d'un mateix continent i entre aquests (Hubálek i Halouzka, 1999, Vallés i Sánchez, 2000).

El cicle és rural, però pot arribar a ser urbà. El primer cas és el més habitual, mentre que el segon comporta la presència de mosquits urbans i rurals que piquin aus i humans. Aquest és el cas de *Cx. pipiens* tal com sembla que va succeir a Bucarest entre 1996 i 1997 (Savage et al, 1999). Aquest

cicle d'activitat picadora pot allargar-se si els mosquits es desenvolupen en hàbitats intradomiciliaris com subsòls inundats poc afectats pel clima extern.

A banda dels mosquits, vectors principals, el virus s'ha trobat en altres artròpodes hematòfags com paparres dels gèneres *Ornithodoros*, *Rhipicephalus* o *Dermacentor*.

El virus s'ha detectat en més de 50 espècies de mosquits, la majoria picadores d'aus i principalment dels gèneres *Culex*, *Ochlerotatus* i *Aedes*. No sembla que hi hagi una adaptació específica del virus en determinades espècies, a diferència del que succeeix en altres malalties arbovíriques com el dengue o la febre groga i en d'altres de vectorials com el paludisme. Contínuament es detecta el virus en noves espècies de mosquits.

Les espècies europees que s'han trobat com a vectors han estat, fins ara, les següents:

Culex pipiens
Culex modestus
Aedes vexans
Ochlerotatus cantans
Ochlerotatus excrucians
Ochlerotatus caspius
Anopheles maculipennis
Coquillettidia richiardii

(Hubálek i Halouzka, 1999, Lundström, 1999, Kulasekera et al, 2001, Hubálek et al, 2003). Pel que es coneix de la transmissió a Europa i als Estats Units, sembla que algunes espècies de mosquits, com *Cx. pipiens*, o diverses espècies del gènere *Culiseta*, especialment ornitòfiles, mantenen la transmissió entre les aus i que, puntualment, aquestes mateixes espècies o d'altres d'anomenades pont (*Culex tarsalis*, *Ae. vexans*), transmeten el virus a altres vertebrats, com humans o cavalls. *Cx. pipiens* és l'espècie més implicada en la transmissió (Kilpatrick, 2005, Molaei et al, 2007).

S'ha pogut determinar que el virus roman en mosquits hivernants en espècies del gènere *Culex* (Deubel et al, 2001, Nasci et al, 2001) i que existeix transmissió vertical, és a dir, de generació en generació, a través dels ous (Miller et al, 2000).

La malaltia causada en humans es caracteritza per un període curt d'incubació de 3-14 dies i febre moderada (3-5 dies) amb cefalees, miàlgia, artràlgia, limfadenopatia i en menys del 15 % meningitis o encefalitis asèptica aguda. El pic de virèmia apareix als 4-8 dies. La recuperació és completa i la majoria de casos letals (del 3 al 15 %) s'ha descrit en majors de 50 anys.

En animals, afecta principalment equins i aus tot i que en alguns altres vertebrats també s'ha pogut aïllar el virus.

La malaltia en cavalls es anomenada *lourdigé* en francès, i causa paràlisi de les extremitats i feblesa en la forma encefalomièltica. En aus no és freqüent observar símptomes, ni tan sols inoculant experimentalment el virus. Així i tot produeix una elevada letalitat, especialment en còrvids, tot i que afecta un gran nombre d'espècies diferents, com s'ha pogut veure als Estats Units ja que fins al 2010, havien estat positives per al virus 326 espècies d'aus. (CDC, 2010a).

Els vectors: culícids

Les espècies de mosquits presents a Espanya estan molt ben documentades gràcies als excel·lents estudis malariològics duts a terme fins a mitjans del segle XX i a les actualitzacions fetes les darreres dècades. La primera revisió la va fer Arias Encobet (1912), qui va publicar una llista que incloïa 12 culícids. Una mica més tard, el 1930, i gràcies a la creació de la *Comisión Central Antipalúdica*, els germans De Buen, Gil Collado, Caballero i d'altres van permetre allargar la llista fins a una trentena.

Després de la Gerra Civil, els treballs duts a terme van ampliar la llista amb les troballes de diferents autors (Clavero, 1946, Rico-Avelló y Rico, 1950, Romeo Viamonte, 1950, Torres Cañamares, 1951, Gil Collado, 1954). Finalment, i recollint tots els treballs publicats fins a la data, Encinas Grandes fa el 1982 una revisió precisa dels mosquits a Espanya, deixant en 56 el nombre d'espècies per Espanya, Balears i les illes Canàries.

Amb la creació del primer SCM modern a Catalunya, en concret als Aiguamolls de l'Empordà, aquell mateix 1982, es va reprendre l'estudi dels culícids. Gràcies a l'esforç de la resta de serveis que es van crear a partir d'aquell moment, el 2000 es va publicar la llista d'espècies d'Espanya (Eritja et al, 2000) que va quedar amb 59 espècies de culícids amb la inclusió de *Culex torrentium* (Aranda et al, 2000) com a nova espècie per al país. El 2004 es va recollir per primera vegada a la península Ibèrica l'*Ae. albopictus* (Aranda et al, 2006) i des d'aleshores no hi ha hagut cap inclusió nova a la llista d'espècies de mosquits de Catalunya i d'Espanya.

Val a dir que de les teòriques 60 espècies, almenys 2, *Ae. aegypti* i *Anopheles labranchiae*, semblen extingides a tot Espanya, i encara fins a 6 més són força dubtoses en no haver-se pogut confirmar la troballa inicial o semblar errònia la identificació puntual.

Cal fer esment aquí de la controvèrsia actual en la nomenclatura dels culícids, des que el 2000, Reinert i col·laboradors, en un treball publicat al Journal of The American Mosquito Control va revisar la família i va elevar a rang de gènere el subgènere *Ochlerotatus*. D'aquesta manera, una part de les espècies del gènere *Aedes* es van treure d'aquest darrer i van passar a formar part del nou gènere *Ochlerotatus*. Pocs anys després, el 2004, un grup de taxònoms i sistemàtics encapçalats per Reinert van publicar un nou treball en el qual es dinamitava la classificació dels Aedins que van passar de 12 a 46 gèneres i en el qual entre d'altres, *Ae. aegypti* i *Ae. albopictus* s'havien d'anomenar *Stegomyia aegypti* i *Stegomyia albopicta* respectivament.

Aquest autor manté la nomenclatura antiga en tots els casos excepte en el del gènere *Ochlerotatus*, ja que és, ara per ara, la nomenclatura més acceptada per a aquest grup i criteri també per a la majoria de publicacions científiques (Higgs, 2005, JME Editors, 2005).

Seguint la bibliografia citada i la nomenclatura escollida, la llista de culícids a Espanya, incloent-hi les noves troballes, cites dubtoses i espècies molt probablement desaparegudes, queda tal com s'indica a continuació. Els taxons estan ordenats alfabètic seguint l'obra de Knight i Stone (1977) i els seus suplementos d'actualització.

Subfamília Anophelinae

Gènere *Anopheles* Meigen, 1818

Subgènere *Anopheles* Meigen, 1818

algeriensis Theobald, 1903

atroparvus Van Thiel, 1927

claviger (Meigen, 1804)

hyrcanus (Pallas, 1771)

labranchiae Falleroni, 1926

maculipennis Meigen, 1818

marteri Senevet i Prunelle, 1927

melanoon Hackett, 1934

petragnani Del Vecchio, 1939

plumbeus Stephens, 1828

Subgènere *Cellia* Theobald, 1902

cinereus Theobald, 1901

multicolor Cambouliu, 1902

superpictus Grassi, 1899

Subfamília Culicinae

Tribu Aedini

Gènere *Aedes* Meigen, 1818

Subgènere *Aedes* Meigen, 1818
geminus Peus, 1970

Subgènere *Aedimorphus* Theobald, 1903
vexans (Meigen, 1830)
vittatus (Bigot, 1861)

Subgènere *Finlaya* Theobald, 1903
echinus (Edwards, 1920)
geniculatus (Olivier, 1791)
gilcolladoi Sánchez-Covisa et al, 1985

Subgènere *Rusticooidus* Shevchenko i Prudkina, 1973
quasirusticus Torres Cañamares, 1951
refiki Medschid, 1928
rusticus (Rossi, 1790)

Subgènere *Stegomyia* Theobald, 1901
aegypti (Linnaeus, 1762)
albopictus (Skuse, 1894)

Gènere *Ochlerotatus* Lynch Arribalzaga, 1891

berlandi Séguy, 1921
cantans (Meigen, 1818)
caspicus (Pallas, 1771)
cataphylla Dyar, 1916
detritus (Haliday, 1833)
dorsalis (Meigen, 1830)
flavescens (Müller, 1764)
leucomelas (Meigen, 1804)
mariae (Sergent i Sergent, 1903)
pulcritarsis (Rondani, 1872)
pullatus (Coquillett, 1904)
punctor (Kirby, 1837)
sticticus (Meigen, 1838)
surcoufi (Theobald, 1912)
zammitii (Theobald, 1903)

Tribu Culicini

Gènere *Culex* Linnaeus, 1758

Subgènere *Barraudius* Edwards, 1921
modestus Ficalbi, 1890

Subgènere *Culex* Linnaeus, 1758
laticinctus Edwards, 1913
mimeticus Noé, 1899

pipiens Linnaeus, 1758
theileri Theobald, 1903
torrentium Martini, 1925
univittatus Theobald, 1901

Subgènere *Maillotia* Theobald, 1907
deserticola Kirkpatrick, 1925
hortensis Ficalbi, 1889

Subgènere *Neoculex* Dyar, 1905
impudicus Ficalbi, 1890
territans Walker, 1856

Tribu Culisetini

Gènere *Culiseta* Felt, 1904
Subgènere *Allotheobaldia* Broelemann, 1919
longiareolata (Macquart, 1838)

Subgènere *Culicella* Felt, 1904
fumipennis (Stephens, 1825)
litorea (Shute, 1928)
morsitans (Theobald, 1901)

Subgènere *Culiseta* Felt, 1904
annulata (Schrank, 1776)
subochrea (Edwards, 1921)

Tribu Mansoniini

Gènere *Coquillettidia* Dyar, 1905
Subgènere *Coquillettidia* Dyar, 1905
buxtoni (Edwards, 1923)
richiardi (Ficalbi, 1889)

Tribu Orthopodomyiini

Gènere *Orthopodomyia* Theobald, 1904
pulcripalpis (Rondani, 1872)

Tribu Uranotaeniini

Gènere *Uranotaenia* Lynch Arribalzaga, 1891
Subgènere *Pseudoficalbia* Theobald, 1912
unguiculata Edwards, 1913

Malgrat que en les llengües llatines el nom comú *mosquit* s'aplica sovint a qualsevol insecte volador de mida petita, de manera estricta, cal considerar mosquits únicament aquells dípters hematòfags que pertanyen a la família dels culícids (Diptera: Culicidae), amb més de 3.000 espècies agrupades en subfamílies, tribus, gèneres i subgèneres, presents a tot el planeta, exceptuant-ne els oceans i les zones polars.

Totes les espècies de culícids presenten una metamorfosi completa i colonitzen dos medis tan diferents com l'aeri i l'aquàtic. Des d'aigües fortament contaminades on es desenvolupa *Cx. pipiens*, un dels mosquits distribuïts més àmpliament, fins a marges de rius d'alta muntanya, passant per maresmes, aiguamolls, forats d'arbres i tota mena de recipients artificials en els quals es pugi acumular aigua, trobem larves de mosquits que exploten hàbitats aquàtics amb adaptacions específiques a les condicions més variades.

Com és habitual en els insectes, les fases del cicle vital dels culícids són les d'ou, larva, pupa i adult. Els ous, en nombre de 100 a 200, són dipositats per una femella sobre la superfície de l'aigua o en el seu entorn immediat, de manera aïllada o formant una agrupació anomenada *navícula* com en el cas dels gèneres *Culex* i *Culiseta*. Poden presentar adaptacions per permetre'n la flotabilitat a l'aigua com succeeix en el gènere *Anopheles*, en el qual els ous disposen de sacs aerífers.

Altres espècies, com les dels gèneres *Aedes* i *Ochlerotatus*, dipositen els ous de manera aïllada sobre el fang o substrats durs i estan adaptats a la dessecació, ja que disposen d'una cutícula molt resistent a la deshidratació. Aquests ous poden restar sobre el terreny diversos anys i mantenir-se'n una bona part encara viables.

L'eclosió dels ous condueix a l'aparició de les larves sempre que hi hagi aigua i que la temperatura sigui prou elevada com per permetre el desenvolupament complet del cicle vital.

Les larves presenten una important adaptació que les allibera de dependre de l'oxigen dissolt a l'aigua per a respirar. L'espíacle està modificat i consisteix en una estructura que s'obre a l'extrem de l'abdomen, en el segment desè, i que en la subfamília Culicinae és un sífó aparent i en forma de tub i en la subfamília Anophelinae és simplement una obertura al final de l'abdomen.

En no dependre de l'oxigen dissolt, el sífó permet de colonitzar masses d'aigua amb un alt contingut en matèria orgànica, però limitades en oxigen.

Les larves passen per quatre estadis de creixement i finalment arriben a la fase de pupa, moment en el qual romanen sense alimentar-se fins a completar la metamorfosi. El temps de desenvolupament larvari depèn de les espècies i de la temperatura, però pot arribar a ser de només cinc dies.

La pupa és mòbil, no s'alimenta i presenta dos òrgans: les trompetes respiratòries a la part tronco-encefàlica. La resta del cos és conformat per l'abdomen, que acaba en dues paletes natatòries. A la majoria d'espècies, després d'aproximadament dos dies, la pupa dona lloc a l'adult (Fig. 4).

Un cop emergits, els mascles resten en repòs aproximadament 24 hores per poder rotar correctament l'aparell genital i que aquest sigui funcional. Immediatament, busquen activament les femelles per fecundar-les en una única còpula, de manera que aporten per a tota la vida de la femella, suficients espermatozoides que guardaran en unes estructures especials anomenades *espermateques*. Després de la còpula, la vida dels mascles es perllonga molt poc i poden romandre encara uns quants dies nodrint-se de suc i nèctars vegetals. Les femelles, però, un cop realitzada la còpula, es mobilitzen per poder complir durant la seva vida el major nombre possible de postes. En general, i per a cada posta, és necessari ingerir sang de vertebrats, incloent-hi d'humans, en el que s'anomena *cicle trofogònic*. Algunes espècies tenen una adaptació anomenada *autogènia* que els permet de poder fer una primera posta més petita sense necessitat d'haver ingerit sang. Una de les espècies que més mostra aquesta adaptació és *Cx. pipiens*.

L'activitat picadora de les femelles té lloc en general, en les hores crepusculars, moment que sol coincidir amb el període de repòs dels hostes i amb un grau d'humitat ambiental elevat. Això no vol dir que no es trobin espècies com algunes dels gèneres *Aedes* o *Ochlerotatus* molt agressives i que, malgrat que piquen preferentment durant el crepuscle, també ho pugin fer a qualsevol hora del dia o fins i tot preferentment durant les hores diürnes.

Moltes espècies mostren diferents sistemes de diapausa per poder superar els moments en què el manteniment del cicle vital es veu interromput per causes naturals. Les espècies de zones

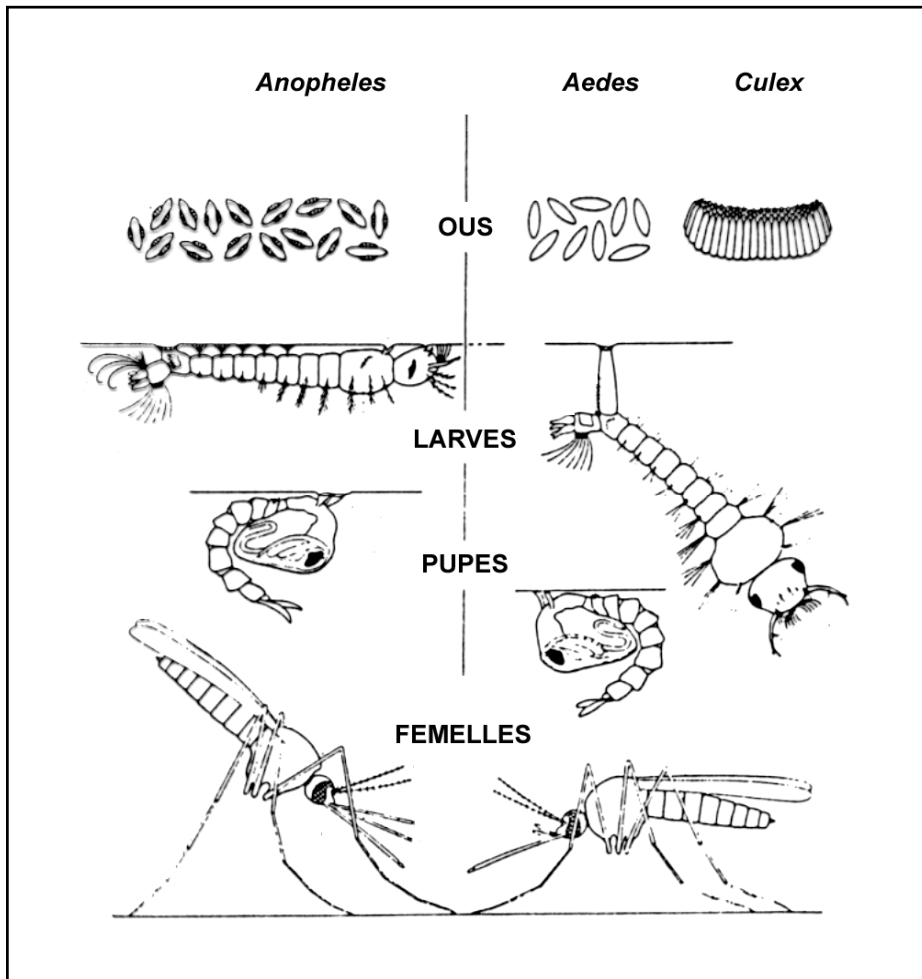


Figura 4. Cicle vital dels culícids. Modificat de WHO, 1991.

temperades superen els mesos freds de l'any gràcies a femelles, larves o ous hivernants. En general és més comuna l'adaptació de les femelles o dels ous, mentre que l'adaptació a la diapausa de les larves és menys freqüent, com en el cas de *Culiseta longiareolata*.

Les femelles hivernants romanen en llocs de refugi com coves o forats als arbres amb una temperatura baixa però constant i una humitat elevada. L'inici de la hibernació està donat per l'aparició de determinats paràmetres com baixa temperatura i disminució de les hores de sol.

Els ous en diapausa permeten l'espècie en qüestió de passar els períodes en què els punts de cria no tenen aigua atès que no estan submergits i les èpoques fredes. Aquesta adaptació fa que puguin superar els períodes adversos, però alhora comporta altres implicacions, ja que permet el manteniment de la transmissió de patògens que, d'altra manera, s'aturaria en desaparèixer tots els efectius poblacionals (Clements, 1992, Clements, 1999, Service, 1993).

Com la majoria d'artròpodes hematòfags, els culícids són vectors potencials de diversos patògens. Es pot afirmar que són els organismes superiors que, indirectament, més morts causen als humans. La malària humana o paludisme és la malaltia infecciosa més àmpliament distribuïda i persistent en el món. Actualment el 40 % de la població mundial es troba sota l'amenaça d'alguna de les quatre espècies de protozous paràsits del gènere *Plasmodium* en les zones de risc, amb un nombre variable entre 300 i 500 milions de persones malaltes i sobre un milió de morts anuals (CDC, 2010b). Les zones del món més afectades per aquesta malaltia són als tròpics i al voltant de la zona de l'equador. Tan sols poden transmetre la malaltia les espècies que pertanyent al gènere *Anopheles*. Cal recordar que a Espanya no va ser fins al 1963 quan l'OMS va declarar el país lliure

de la malaltia (Pletsch, 1965). El 1943 hi va haver més de 380.000 casos registrats, amb un 10 % de letalitat (Rico-Avello y Rico, 1950, Clavero, 1961).

Els vectors: flebòtoms

Els flebòtoms pertanyen a la subfamília Phlebotominae dins de la família Psychodidae. Són dípters petits d'1-3 mm, de color marró clar i fàcilment distingibles per l'aspecte pilós i per la forma lanceolada en punta de les ales.

Les femelles dipositen els ous en grups de diverses desenes al terra humit i a tota mena d'esquerdes del substrat. A causa d'aquest tipus d'hàbitat larvari, les larves són molt difícils de localitzar. No tenen, per tant, cap relació amb masses d'aigua, a diferència dels culícids.

Les larves eclosionen als pocs dies de la posta i s'alimenten de restes de matèria orgànica. El temps de desenvolupament és variable i en aquest període passen per quatre estadis larvaris. Finalment, i

a l'igual que en el cas dels culícids, es transformen en la pupa, que no s'alimenta, (Eldridge i Edman, 2000) (Fig. 5).

El temps total de desenvolupament larvari depèn de l'espècie, de la temperatura i de la disponibilitat d'aliment, però en general, es més llarg que en els culícids arribant a unes 6-7 setmanes en *Phlebotomus papatasi*. Al nostre entorn, els adults són presents en els mesos de primavera i estiu i no es dispersen gaire dels llocs de naixement. Les femelles de flebòtom fan vols molt curts i piquen a les extremitats inferiors principalment al crepuscle.

El seu comportament picador i la seva mida fa que sigui difícil detectar-los. L'apetència tròfica és molt variable, havent-hi espècies adaptades a picar rèptils (*Sergentomyia minuta*). Són principalment crepusculars i exòfils.

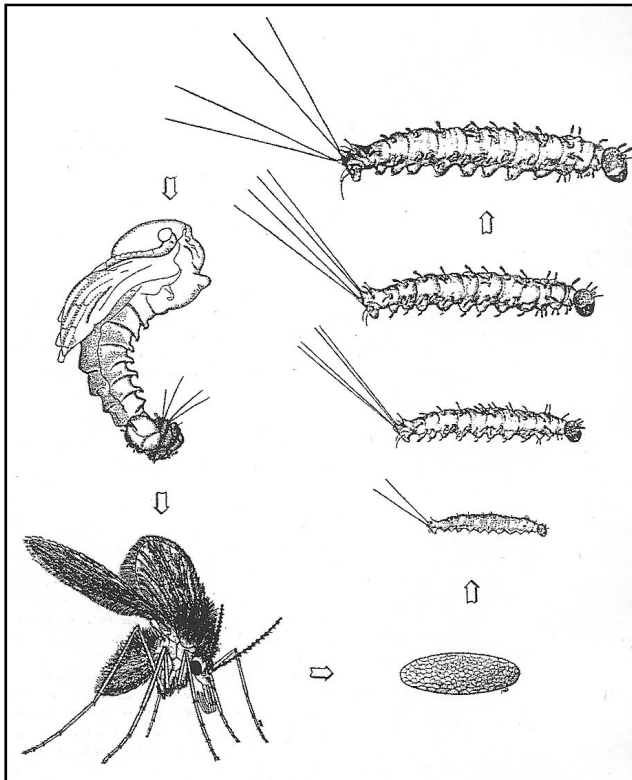


Figura 5. Cicle biològic dels flebòtoms. Adaptat d'Eldridge i Edman.

Cal remarcar que a Catalunya i en altres zones com a Granada, hi ha localment àrees amb una gran densitat de flebòtoms i que la leishmaniosi canina continua sent un problema important (Lucientes Curdi, 1986, Botet, 1991, Gállego et al, 1992, Aransay et al, 2004).

A la zona estudiada en aquest treball, es van detectar prèviament les espècies *Phlebotomus perniciosus*, un vector conegut del virus Toscana (TOSV), *Phlebotomus ariasi*, *Phlebotomus sergenti* i *S. minuta*, amb la primera com a espècie significativament més abundant. (Mezquida, 1990, Aranda i Eritja, 1998).

A Espanya, la llista actual d'espècies tal com figura a *Fauna Ibèrica*, 2002 i a Alvar, 2001, és la següent:

Subfamília Phlebotominae

Gènere *Sergentomyia* França i Parrot, 1920
 Subgènere *Sergentomyia* França y Parrot, 1920
minuta (Rondani, 1843)

Gènere *Phlebotomus* Rondani, 1843
 Subgènere *Phlebotomus* Rondani, 1843
papatasi (Scopoli, 1786)

Subgènere *Larrousius* Nitzulescu, 1931
ariasii Tonnoir, 1921
langeroni Nitzulescu, 1930
longicuspis Nitzulescu, 1930
perniciosus Newstead, 1911

Subgènere *Paraphlebotomus* Theodor, 1948
alexandri Sinton, 1928
chabaudi Croset, Abonnenc i Rioux, 1970
riouxi Depaquit, Leger i Killick-Kendrick, 1998
sergenti Parrot, 1917

Subgènere *Adlerius* Nitzulescu, 1931
mascittii Grassi, 1908

Estudis previs a la publicació d'aquesta tesi situen Espanya i en concret Granada, com una zona amb una important transmissió del TOSV on s'ha trobat una prevalença en humans del 24,9 % (Sanbonmatsu-Gámez, 2005).

Metodologia entomològica: recollida de mostres i tipus de captura

En aquest estudi, la metodologia emprada per obtenir mostres entomològiques ha depès de la que ja hi havia en cada centre participant i de l'objectiu de l'estudi, que és, com ja s'ha dit, detectar genoma d'arbovirus en mostres d'artròpodes. La participació de grups tan diversos en la captura de mosquits només ha estat possible utilitzant les metodologies diverses pròpies de cada centre i adaptades a les peculiars condicions de cada àrea. Per aquesta raó, la metodologia de captura de les mostres és diferent en cada un dels SCM participants, fet que cal considerar a l'hora de comparar les dades obtingudes de cada centre.

Les captures s'han dut a terme en diverses localitats de les quatre àrees estudiades, principalment en hàbitats de maresma i aiguamolls entre maig i novembre. Cada SCM ha aprofitat les rutines de captura de mosquits habituals que abastaven captures sobre humà, trampes CDC i trampes lumíniques EVS amb CO₂ (Foto 1). Els insectes s'han agrupat en pools segons la data, la localitat, el sexe i l'espècie. Cal destacar que a causa de la impossibilitat de classificar els flebotoms per la morfologia externa i per no haver de fer disseccions que podien malmetre la mostra, tots aquests dípters s'han agrupat per subfamília i no per espècie.

Localització de les trampes

Tres dels aiguamolls seleccionats per a la vigilància entomològica es troben a Catalunya: la badia de Roses a Girona, el Baix Llobregat a Barcelona i el Delta de l'Ebre a Tarragona. El quart és al sud-est d'Espanya, a Andalusia, a les *Marismas del Odiel* i al parc nacional de Doñana, a Huelva (Fig. 6).

Totes quatre zones són àrees de descans per a aus migradores i residents i es troben en vies de migració entre l'Àfrica i Europa. En totes hi ha importants poblacions de mosquits. També s'hi troben cavalls i ramats en quantitats variables tant establats com en condicions de semilibertat, en especial a les zones protegides de les àrees naturals.



Fotografia 1. Trampa EVS amb CO₂

maresmes, en el qual es localitzen diverses poblacions. Els mosquits s'han capturat en 13 localitats tant periurbanes com rurals i naturals amb esquer humana i setmanalment durant els 30 minuts posteriors al capvespre.

A Andalusia, l'únic SCM existent es troba a la província de Huelva, al llarg de les maresmes mareals del riu Guadalquivir, incloent-hi les maresmes de l'Odiel i el parc nacional de Doñana. En aquesta àrea les captures s'han dut a terme cada setmana amb trapes CDC en 10 localitats que representen maresmes i altres zones humides. Com en els casos anteriors, les trapes s'instal·laven a la tarda i es recollien al dia següent, després de la sortida de sol.

Al llarg de l'estudi, s'ha fet un estudi regular de la majoria de localitats, mentre que d'altres s'han utilitzat ocasionalment a causa de condicions locals específiques com canvis meteorològics o explosió de poblacions de mosquits.

La badia de Roses es troba a la costa, a la comarca de l'Alt Empordà a Girona. Forma una badia amb llacunes, maresmes i aiguamolls. En aquesta àrea s'han recollit mostres en 4 localitats cada quinze dies utilitzant trapes CDC (John Hock, EUA) col·locades en granges de vaques i estables. Les trapes s'instal·laven a la tarda i es recollien al dia següent, després de la sortida de sol.

La comarca del Baix Llobregat es localitza al sud de la ciutat de Barcelona, en part al delta del Llobregat, i inclou zones agrícoles, llacunes i maresmes. Les captures s'han dut a terme quinzenalment utilitzant trapes EVS amb CO₂ (Bioquip, EUA) en fins a 33 localitats diferents que representaven zones urbanes, agrícoles i naturals. Les trapes s'instal·laven a la tarda i es recollien al dia següent, després de la sortida de sol.

El Delta de l'Ebre es troba entre el Montsià i el Baix Ebre a Tarragona. És un delta quasi completament cobert d'arrossars, llacunes i

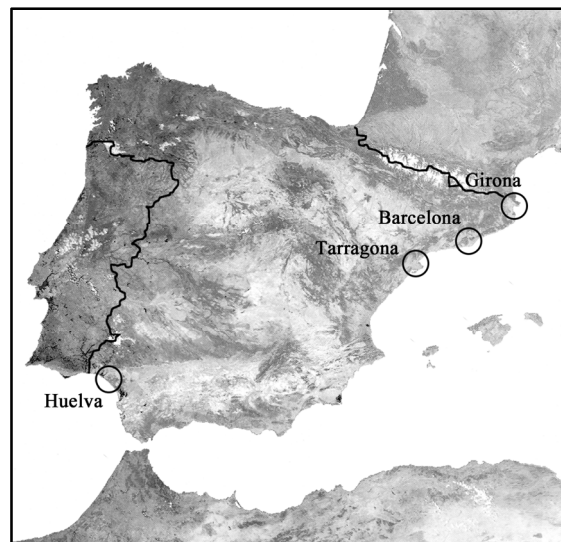


Figura 6. Localització de les quatre zones estudiades.

ARTICLES PUBLICATS

En aquesta secció es troben per ordre de publicació, els articles que formen el conjunt d'aquesta tesi. Cal tenir en compte que en el moment de la redacció, el darrer article es trobava encara *online, ahead of print*, per ser publicat en el segon o tercer volum de Vector-Borne and Zoonotic Diseases de 2010.

Article 1

Aranda, C, Eritja, R, Roiz, D. 2006. First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. Medical and Veterinary Entomology. Vol 20: 150-152.

Article 2

Busquets, N, Alba, A, Allepuz, A, Aranda, C, Núñez, JI. 2008. Usutu Virus Sequences in *Culex pipiens* (Diptera: *Culicidae*), Spain. Emerging Infectious Diseases. Vol 14(5): 861-863.

Article 3

Aranda, C, Sánchez-Seco, MP, Cáceres, F, Escosa, R, Gálvez, JC, Masià, M, Marqués, M, Ruíz, S, Alba, A, Busquets, N, Vázquez, A, Castellà, J, Tenorio, A. 2009. Detection and Monitoring of Mosquito Flaviviruses in Spain between 2001 and 2005. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. Vol 9(2): 171-178.

Article 4

Sánchez-Seco, MP, Vázquez, A, Collao, X, Hernández, L, Aranda, C, Ruiz, S, Escosa, R, Marqués, E, Bustillo, MA, Molero, F, Tenorio, A. Surveillance of Arboviruses in Spanish Wetlands: Detection of New Flavi- and Phleboviruses. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. Accepted 13/03/2009. Ahead of print. doi:10.1089/vbz.2008.0188.

Article 1

Aranda, C, Eritja, R, Roiz, D. 2006. First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. Medical and Veterinary Entomology. Vol 20: 150-152.

SHORT COMMUNICATION

First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain

C. ARANDA¹, R. ERITJA¹ and D. ROIZ²

¹Servei de Control de Mosquits, Consell Comarcal del Baix Llobregat, Barcelona and ²Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Zaragoza, Spain

Abstract. The invasive mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) was detected for the first time in Spain, in Sant Cugat del Vallès, a city in the north-east of the country (41°28' N, 2°4' E, altitude 120 m), during August 2004. A male and one larva were collected in the backyard of a house and in a tree hole, respectively. Dense populations of adults and larvae were found in subsequent surveys, confirming the establishment of the species in the area. This is the first report of the establishment of this species in the Iberian Peninsula.

Key words. *Aedes albopictus*, exotic, invasive, Spain.

Native to the Oriental Region (Hawley, 1988), the so-called 'tiger mosquito', *Aedes albopictus* (Skuse), has been reported in more than 25 countries on the five continents outside its natural region since the end of the 1970s, and is an important vector of several arboviruses, including dengue, yellow fever and diverse types of encephalitis (Mitchell, 1995; Gratz, 2004). *Aedes albopictus* is a competent laboratory vector of at least 23 arboviruses and also of *Dirofilaria* species (Mitchell, 1995), with an important role as a rural vector of dengue (Gratz, 2004). In the U.S.A. and Italy, countries where this mosquito has been established for more than a decade, transmission of viruses to humans has not been proven (Romi, 2001), although viruses such as West Nile, La Crosse and eastern equine encephalitis have been detected in this species in the U.S.A. (Holick *et al.*, 2002; Gratz, 2004). In both countries, *Dirofilaria* species have been detected in this mosquito (Cancrini *et al.*, 2003; Comiskey & Wesson, 1995). These canine nematodes, which can affect humans, are also present in Spain (Simon *et al.*, 1996; Aranda *et al.*, 1998).

The usual means of dispersal of this invasive species is the transport of eggs in used tyres (Knudsen, 1995), although international trade of the decorative plant, Lucky Bamboo (*Dracaena* spp.), has also been implicated (Madon *et al.*, 2002).

The first modern establishment outside its original range was reported in 1979 in Albania (Adhami & Murati 1987, cited by Adhami & Reiter, 1998). In the Americas, the first established population of *Aedes albopictus* was detected in

1985, in Texas, U.S.A. (Sprenger & Wuithiranyagool, 1986). Adaptation to cold suggested that the strain probably came from a non-tropical area of Asia, as was confirmed by specimen detection in tyres coming from Japan (Reiter, 1998). *Aedes albopictus* reached Brazil in 1986, Mexico two years later and many countries of Central and South America thereafter (Rossi *et al.*, 1999). In Africa, the species was detected in South Africa in 1990 (Cornel & Hunt, 1991) and found to be established in Nigeria, Cameroon (Fontenille & Toto, 2001) and Equatorial Guinea (Toto *et al.*, 2003). In Europe, following detection in Albania as early as 1979, the species was reported in Italy in 1991 as a large population near Padua (Dalla Pozza & Majori, 1992), with invasion of other regions of that country in subsequent years (Romi, 2001). Established populations of *Aedes albopictus* were found in two tyre dumps in France in 1999 (Schaffner & Karch, 2000), but both were apparently eradicated by chemical control actions in 2001 (Schaffner, 2002). Belgium was highlighted in 2000 as the fourth European country to prove positive (Schaffner *et al.*, 2004). The species was recently reported from Serbia and Montenegro (Petric *et al.*, 2001), Israel (Pener *et al.*, 2003), Switzerland (Flacio *et al.*, 2004) and Greece (Samanidou *et al.*, 2005). In recent decades, several authors have pointed out that *Aedes albopictus* may have colonized more regions in southern Europe, emphasizing the importance of establishing systems of detection of imported vectors (Knudsen, 1995; Gratz, 2004). The Spanish arbovirus and arthropod

Correspondence: Carlos Aranda, Consell Comarcal del Baix Llobregat. Parc Torreblanca, CN 340 s/n. 08980 Sant Feliu de Llobregat, Spain. Tel.: 34 93 6401399; fax: 34 93 3788245; e-mail: Caranda@elbaixllobregat.net

surveillance network, EVITAR, has developed a monitoring system in response to the perceived risk situation in the country (Eritja *et al.*, 2005). Surveillance in used-tyre storage facilities during 2003 and 2004, did not reveal any exotic mosquito species.

On August 9, 2004, continuous complaints about the presence of black flies in the city of Sant Cugat del Vallès led the Mosquito Control Service (MCS) of the Baix Llobregat Council to survey the area. Sant Cugat del Vallès (41°28' N, 2°4' E, altitude 120 m) is a residential area with more than 70 000 inhabitants, located in the county of Vallès Occidental. The city is 15 km north-east of Barcelona, the capital of Catalonia, and has a Mediterranean climate with annual average minimum temperatures of 10.2°C and average annual rainfall of 605 mm. During inspections of possible black-fly breeding sites, some mosquito habitats were also sampled. One male mosquito was collected in a house and some mosquito larvae were detected in neighbouring tree holes. In the laboratory, the male and another male that emerged from the larvae collections were identified as *Aedes albopictus*. The remaining larvae were identified as *Culex pipiens* (L.) and *Culiseta longiareolata* (Macquart). On subsequent days, more larvae of *Aedes albopictus* were found in nearby locations, confirming the evidence of an introduction of this species. Later surveys detected adult females, males or immature stages in a wide range of habitats (tyres, small containers, forest areas and parks) throughout the city, showing the establishment of this exotic species in the region. A significant loss in the quality of life in the local community was evidently due to the activity of this mosquito, as has happened in other areas invaded by *Aedes albopictus* (Romi, 2001). Finally, interviews with citizens, local authorities, medical services and consequent inspections indicated that this species had been present in the area for at least two years. Interestingly, no used-tyre dumps or plant nurseries were found associated with the presence of *Aedes albopictus* in the area. Voucher specimens have been deposited in the MCS collection at El Prat de Llobregat, Barcelona, Spain.

The Iberian Peninsula is considered a suitable area for the development of some arthropod borne viruses and evidence of their presence has been reported (Lozano & Filipe, 1986; Filipe & Andrade, 1990). The EVITAR network is at present evaluating the extent and origin of this introduction and cooperates with competent authorities to establish efficient control strategies. Prevention of dispersion of this species to the rest of Spain and Portugal will reduce possible health risks and guard against the high cost of control measures.

This introduction is the first to be reported in the Iberian Peninsula and it is also the first time that an exotic mosquito species has been detected and found to be established in recent times in Spain. It does not seem to be associated with the storage of used tyres or the transport of Lucky Bamboo, the usual means of transportation of immature stages (Knudsen, 1995; Madon *et al.*, 2002). Other possible means of dispersal include transportation of adult

mosquitoes in cars or lorries, although this has not been investigated. There are two major motorways, however, in the area of the infestation.

We consider these data to be of value to research on new means of dispersal and to the development of strategies of detection in threatened areas.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Francis Schaffner from EID Montpellier for the corroboration of the specimens classification. The authors are members of the EVITAR network (Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spanish Ministry of Health; grant no. G03/059).

References

- Adhami, J. & Reiter, P. (1998) Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **14**, 340–343.
- Aranda, C., Panyella, O., Eritja, R. & Castella, J. (1998) Canine filariasis. Importance and transmission in the Baix Llobregat area, Barcelona (Spain). *Veterinary Parasitology*, **77**, 267–275.
- Cancrini, G., Frangipane di Regalbono, A.F., Ricci, I., Tessarin, C., Gabrielli, S. & Pietrobelli, M. (2003) *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Veterinary Parasitology*, **118**, 195–202.
- Comiskey, N. & Wesson, D.M. (1995) *Dirofilaria* (Filarioidea: Onchocercidae) infection in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) collected in Louisiana. *Journal of Medical Entomology*, **32**, 734–737.
- Cornel, A.J. & Hunt, R.H. (1991) *Aedes albopictus* in Africa? First records of live specimens in imported tires in Capetown. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **7**, 107–108.
- Dalla Pozza, G. & Majori, G. (1992) First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **8**, 318–320.
- Eritja, R., Escosa, R., Lucientes, J., Marquès, E., Molina, R., Roiz, D. & Ruiz, S. (2005) Worldwide invasion of vector mosquitoes: present European distribution and challenges for Spain. *Biological Invasions*, **7**, 87–97.
- Filipe, A.R. & Andrade, H.R. (1990) Arboviruses in the Iberian Peninsula. *Acta Virologica*, **34**, 582–591.
- Flacio, E., Lüthy, P., Patocchi, N., Guidotti, F., Tonolla, M. & Peduzzi R. (2004) Primo ritrovamento di *Aedes albopictus* in Svizzera. *Bollettino della Società Ticinese di Scienze Naturali*, **92**, 141–142.
- Fontenille, D. & Toto, J.C. (2001) *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), a potential new Dengue vector in Southern Cameroon. *Emerging Infectious Diseases*, **7**, 1066–1067.
- Gratz, N.G. (2004) Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*, **18**, 215–227.
- Hawley, W.A. (1988) The Biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **4**, 1–39.
- Holick, J., Kyle, A., Ferraro, W., Delaney, R.R. & Iwaseczko, M. (2002) Discovery of *Aedes albopictus* infected with West Nile virus in south eastern Pennsylvania. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **18**, 131.

- Knudsen, A.B. (1995) Global distribution and continuing spread of *Aedes albopictus*. *Parassitologia*, **37**, 91–97.
- Lozano, A. & Filipe, A.R. (1986) Antibodies against the West Nile virus and other arthropod-transmitted viruses in the Ebro Delta region. *Revista Española de Salud Pública*, **72**, 245–250.
- Madon, M., Mulla, M.S., Shaw, M.W., Kluh, S. & Hazelrigg, J.E. (2002) Introduction of *Aedes albopictus* (Skuse) in Southern California and potential for its establishment. *Journal of Vector Ecology*, **27**, 149–154.
- Mitchell, C.J. (1995) The role of *Aedes albopictus* as an arbovirus vector. *Parassitologia*, **37**, 109–113.
- Pener, H., Wilamowski, A., Schnur, H., Orshan, L., Shalom, U. & Bear, A. (2003) *Aedes albopictus* in Israel. *European Mosquito Bulletin*, **14**, 32.
- Petric, D., Pajovic, I., Ignjatovic Cupina, A. & Zgomba, M. (2001) *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) new mosquito species (Diptera, Culicidae) in entomofauna of Yugoslavia. *Symposia of the entomologists of Serbia*, Entomological Society of Serbia, Belgrade, Serbia and Montenegro, Goc, pp. 26–29.
- Reiter, P. (1998) *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988–1995: the shape of the things to come? *Journal of the American Mosquito Control Association*, **14**, 83–94.
- Romi, R. (2001) *Aedes albopictus* in Italia: un problema sanitario sottovalutato. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, **37**, 241–247.
- Rossi, G., Pascual, N. & Krsticevic, F. (1999) First Record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina. *Journal of the American Mosquito Association*, **15**, 422–422.
- Samanidou-Voyadjoglou, A., Patsoula, E., Spanakos, G. & Vakalis, N.C. (2005) Confirmation of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Greece. *European Mosquito Bulletin*, **19**, 10–12.
- Schaffner, F. (2002) *Rapport scientifique des opérations de surveillance et de traitement d'Aedes albopictus et autres espèces exotiques importées*. Internal administrative report, EID Méditerranée – ADEGE, Montpellier, France.
- Schaffner, F. & Karch, S. (2000) Première observation d'*Aedes albopictus* (Skuse, 1894) en France métropolitaine. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, Sciences de la Vie*, **323**, 373–375.
- Schaffner, F., Van Bortel, W. & Coosemans, M. (2004) First record of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in Belgium. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **20**, 201–203.
- Simon, F., Cordero, M., Muro, A., Perera, L., Espinoza, E. & Santamaria, B. (1996) Public health problems due to *Dirofilaria*: the Spanish situation. *Veterinary Research Communications*, **20**, 340–344.
- Sprenger, D. & Wuithiranyagool, T. (1986) The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **2**, 217–219.
- Toto, J.C., Abaga, S., Carnevale, P. & Simard, F. (2003) First report of the oriental mosquito *Aedes albopictus* on the West African island of Bioko, Equatorial Guinea. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**, 343–346.

Accepted 16 November 2005

Article 2

Busquets, N, Alba, A, Allepuz, A, Aranda, C, Núñez, JI. 2008. Usutu Virus Sequences in *Culex pipiens* (Diptera: *Culicidae*), Spain. *Emerging Infectious Diseases*. Vol 14(5): 861-863.

Table. Incidence of resistance/decreased susceptibility to key antimicrobial agents in isolates of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A, United Kingdom, 2001–2006*

Year	No. studied	% <i>S. Typhi</i> resistant to					No. studied	% <i>S. Paratyphi A</i> resistant to				
		C	A	Tm	Cp _L	Cp _H		C	A	Tm	Cp _L	Cp _H
2001	170	24	23	23	35	0	232	28	27	27	23	2
2002	150	18	17	17	35	1	149	10	9	10	39	3
2003	218	20	20	21	43	1	177	17	18	17	65	12
2004	215	23	23	24	47	2	221	5	5	5	70	14
2005	222	29	29	29	62	2	217	7	7	7	60	12
2006	240	23	24	24	68	2	278	2	3	2	64	9

*C, chloramphenicol; A, ampicillin, Tm, trimethoprim, Cp_L, ciprofloxacin MIC 0.25–1.0 mg/L; Cp_H, ciprofloxacin MIC >1.0 mg/L. No isolates exhibited resistance to ceftriaxone or cefotaxime; of 50 *S. Typhi* and 40 *S. Paratyphi A* isolated in 2005 and 2006, the MIC to azithromycin by E test (AB Biodisk, Solna, Sweden) was not greater than 8 mg/L for *S. Typhi* and 12 mg/L for *S. Paratyphi A*, which corresponds to those of drug-sensitive controls of the respective serotypes.

enteric fever in the United Kingdom has been seriously jeopardized. In cases of treatment failures, commonly used alternative antimicrobial agents have included third-generation cephalosporins such as ceftriaxone. The macrolide antimicrobial azithromycin is also being increasingly used, particularly for patients with hypersensitivity to penicillins (5). With this in mind, 50 *S. Typhi* and 40 *S. Paratyphi A* strains isolated from January 2005 through December 2006, which exhibited resistance to ciprofloxacin at 0.125 mg/L, were tested for resistance to azithromycin by Etest. Results indicated that none of the isolates of *S. Typhi* exhibited MICs >8 mg/L, which corresponded to the MIC to azithromycin of a drug-sensitive control strain of *S. Typhi* (range 4–8 mg/L, MIC₉₀ 6 mg/L). For *S. Paratyphi A*, none of the isolates exhibited MICs >12 mg/L, corresponding to that of a drug-sensitive control strain of this serovar (range 6–12 mg/L, MIC₉₀ 10 mg/L). Although there are no definitive data on resistance levels for azithromycin in relation to treatment of typhoid and paratyphoid, these findings suggest that resistance to this antimicrobial agent in terms of treatment efficacy has not yet been jeopardized.

These results indicate that the availability of effective antimicrobial agents for the treatment of typhoid and paratyphoid infection is becoming increasingly limited for patients in the United Kingdom. Nevertheless, despite the dramatic upsurge in the oc-

currence of strains with decreased susceptibility, ciprofloxacin still remains the drug of choice for many physicians. It is reassuring that in cases of treatment failure, third-generation cephalosporins such as ceftriaxone and macrolide antimicrobial agents such as azithromycin appear to be viable alternatives.

**E. John Threlfall,*
Elizabeth de Pinna,*
Martin Day,* Joanne Lawrence,*
and Jane Jones***

*Health Protection Agency, London, UK

References

1. Threlfall EJ, Ward LR. Decreased susceptibility to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serotype Typhi, United Kingdom. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:448–50.
2. Rowe B, Ward LR, Threlfall EJ. Ciprofloxacin and typhoid fever. *Lancet.* 1992;339:740.
3. Aarestrup FM, Wiuff C, Mølbak K, Threlfall EJ. Is it time to change the break points for fluoroquinolones for *Salmonella* spp.? *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:827–9.
4. Health Protection Agency. Foreign travel-associated illness in England, Wales and Northern Ireland—2007 report. London: Health Protection Agency; 2007.
5. Threlfall EJ, Day M, De Pinna E, Lewis H, Lawrence J. Drug-resistant enteric fever in the UK. *Lancet.* 2006;367:1576.

Address for correspondence: E. John Threlfall, Health Protection Agency Laboratory of Enteric Pathogens, Centre for Infections, 61 Colindale Ave, London NW9 5EQ, UK; email: john.threlfall@hpa.org.uk

Usutu Virus Sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain

To the Editor: *Usutu virus* (USUV) is an arbovirus and a member of the mosquito-borne cluster within the *Flavivirus* genus. USUV belongs to the *Japanese encephalitis virus* antigenic group, which is closely related to pathogens such as *West Nile virus* (WNV) (1).

USUV has been isolated from a human in the Central African Republic and from several mosquito species from tropical and subtropical Africa (2). In late summer 2001, USUV emerged in central Europe and caused deaths in several species of resident birds in Austria (3). However, monitoring of USUV in dead birds from 2003 through 2005 showed that the absolute numbers of USUV-associated bird deaths declined, although USUV detection persisted in bird tissues (4). This decrease in USUV-associated bird deaths was attributed to herd immunity in the bird population (5). In the summer of 2005, USUV was detected in a blackbird in Hungary. The complete genomic sequence of the Hungarian USUV strain shared 99.9% identity with the strain circulating in Austria since 2001 (6). On the other hand, neutralizing antibodies against USUV have been detected in sera of resident and migrant birds

in the United Kingdom without causing an obvious reduction in the bird population (7).

From May through October 2006, monitoring of flaviviruses in mosquitoes was performed in the northeast region of Spain (Catalonia). This monitoring was implemented in the 3 main wetlands of the region: Aiguamolls de la Empordà (Girona Province) near France, where WNV was detected in dead horses in 2000 (8); Delta del Llobregat (Barcelona Province); and Delta de l'Ebre (Tarragona Province). Mosquitoes were collected by mosquito control services in these areas. Female mosquitoes were classified and grouped in pools according to date, species, and localization. During this period, 436 pools belonging to 9 mosquito species were collected. The most abundant species was *Culex pipiens* (n = 168).

Viral RNA was recovered from mosquito pools by homogenization and viral RNA extraction with QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), and then generic reverse transcription (RT)-nested PCR was used to identify flaviviruses (9). This procedure was used to amplify a specific fragment of the NS5 gene within the flavivirus genome. The 143-bp amplification product was detected by electrophoresis and purified by using QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Sequencing reactions were performed with ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing v.3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and analyzed by using an ABI PRISM model 3730 automated sequencer (Applied Biosystems). Assembly of the consensus sequences and translation into amino acid sequences was performed with Larsergene DNASTAR group of programs (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). Comparisons with published sequences of known flaviviruses were performed by searches with FASTA program in EMBL database (available from www.ebi.ac.uk/embl/) to iden-

tify the detected agent and to study the level of homology.

One pool of *Cx. pipiens* captured in the middle of August 2006 from Delta del Llobregat, in a typical Mediterranean climate that contained 3 female mosquitoes, was positive for flaviviruses. That positive pool was obtained from the center of the village of Viladecans, where different common migratory and sedentary birds such as *Passer domesticus*, *Hirundo rustica*, or *Delichon urbica* feed and nest. The Spanish USUV sequence showed 97.97% homology to USUV strain SAAR-1776 from South Africa; it showed 94.94% similarity with USUV strain Vienna 2001 from Austria and USUV strain Budapest from Hungary, with 2-nt and 5-nt differences, respectively (Figure). All of these were synonymous mutations and thus did not result in amino acids replacements. The homology data showed that the Spanish strain belongs to USUV species and is more related to the African USUV isolates than to central European isolates.

To date, no bird deaths observed in Barcelona Province have been associated with viral encephalitis. However, this region is where the USUV-specific RT-PCR-positive samples were obtained from *Cx. pipiens* mosquitoes. One possible explanation for these findings is that Spanish USUV could be naturally avirulent for birds because the African strains of USUV appear to be in Africa. Alternatively, USUV and other related viruses such as WNV may have been circulating

in Spain for many years, as a result of regular reintroduction by birds migrating from Africa. Under such circumstances, natural genetic resistance, herd immunity, and cross-protective immunity caused by related viruses likely provided at least some protection against symptomatic infections. The discovery of USUV-specific RNA, most related to the African strains of USUV, in *Cx. pipiens* in Spain extends previous evidence (7,10) that USUV and related flaviviruses such as WNV are being introduced into western Europe from Africa, presumably by migratory birds.

Acknowledgments

We thank Erika Serrano for technical help and Francesc Xavier Abad for NBS3 laboratories management.

**Núria Busquets,* Anna Alba,*
Alberto Allepuz,*
Carles Aranda,†
and José Ignacio Núñez***

*Centre de Recerca en Sanitat Animal, Barcelona, Spain; and †Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

References

1. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol*. 1998;72:73-83.
2. Adam F, Diguette J-P. Virus d'Afrique (base de données). Centre collaborateur OMS de référence et de recherche pour les arbovirus et les virus de fièvres hémorragiques (CRORA); Institut Pasteur de Dakar [cited 2008 Mar 1]. Available from <http://www.pasteur.fr/recherche/banques/CRORA>

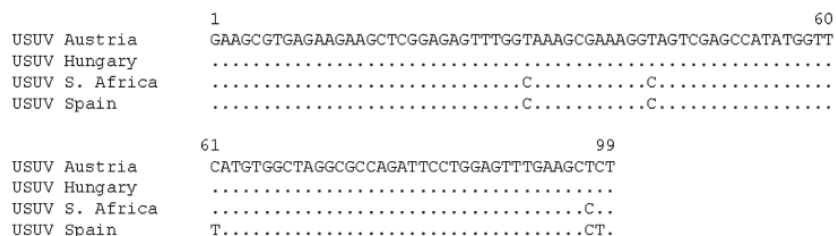


Figure. Comparison at nucleotide level of sequenced fragment among related Usutu virus (USUV). Dot indicates coincident nucleotide. The partial nucleotide sequence of detected Spanish USUV has been deposited in the GenBank database under accession no. AM909649. S. Africa, South Africa.

3. Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, Nowotny N. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne *Flavivirus* of the Japanese encephalitis virus group central Europe. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:652–6.
4. Chvala S, Bakonyi T, Bukovsky C, Meister T, Brugger K, Rubel F, et al. Monitoring of *Usutu virus* activity and spread by using dead bird surveillance in Austria, 2003–2005. *Vet Microbiol*. 2007;122:237–45.
5. Meister T, Lussy H, Bakonyi T, Šikutová S, Rudolf I, Vogl W, et al. Serological evidence of continuing high *Usutu virus* (*Flaviviridae*) activity and establishment of herd immunity in wild birds in Austria. *Vet Microbiol*. 2008;127:237–48.
6. Bakonyi T, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Cörgő T, Lussy H, et al. Emergence of *Usutu virus* in Hungary. *J Clin Microbiol*. 2007;45:3870–4.
7. Buckley A, Dawson A, Moss SR, Hinsley SA, Bellamy PE, Gould EA. Serological evidence of *West Nile virus*, *Usutu virus* and *Sindbis virus* infection of birds in the UK. *J Gen Virol*. 2003;84:2807–17.
8. Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP, Zeller H. West Nile outbreak in horses in Southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:692–6.
9. Sánchez-Seco MP, Rosario D, Domingo C, Hernández L, Valdés K, Guzmán MG, et al. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J Virol Methods*. 2005;126:101–9.
10. Figuerola J, Jiménez-Clavero MA, Rojo G, Gómez-Tejedor C, Soriguer R. Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in colonial aquatic birds in southern Spain. *Avian Pathol*. 2007;36:209–12.

Address for correspondence: Núria Busquets, Unitat de Malalties Víriques, Edifici CRESA, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain; email: nuria.busquets@cresa.uab.es

Letters

Letters commenting on recent articles as well as letters reporting cases, outbreaks, or original research are welcome. Letters commenting on articles should contain no more than 300 words and 5 references; they are more likely to be published if submitted within 4 weeks of the original article's publication. Letters reporting cases, outbreaks, or original research should contain no more than 800 words and 10 references. They may have one Figure or Table and should not be divided into sections. All letters should contain material not previously published and include a word count.

Rotavirus P[4]G2 in a Vaccinated Population, Brazil

To the Editor: Gurgel et al. provide an early examination of postmarketing surveillance data from Brazil, one of the first countries to implement routine childhood immunization with Rotarix vaccine (1). In a community with reported vaccination coverage of 50%, the P[4]G2 strain was detected in all 21 rotavirus-positive stool samples identified during November 2006–February 2007. Although monitoring effectiveness of Rotarix against P[4]G2 strains is of interest (2), the small sample size, short duration of surveillance, and lack of a comparison group preclude firm assessment of an association between P[4]G2 predominance and vaccination.

Because Rotarix was introduced in Brazil in March 2006, most children >12 months old (66 [51%] of 129) in the study were ineligible for vaccination. Genotype P[4]G2 was the only strain identified even in older children, which suggests either a change in disease ecology from vaccination or the random circulation of P[4]G2 strains in the community. Ongoing hospital-based surveillance during 2006 in 3 regional countries that had not introduced rotavirus vaccine (El Salvador, Guatemala, and Honduras) showed that P[4]G2 was the predominant circulating strain (prevalence 68%–81%). Thus, as previously documented (3,4), the predominance of P[4]G2 strains after Rotarix introduction in Brazil could represent a natural shift unrelated to vaccination.

Evaluation of vaccine effectiveness against specific strains will allow full assessment of the public health impact of vaccination. Although the data are sparse in the study from Gurgel et al., a comparison of the odds of vaccination among rotavirus-positive (cases) versus rotavirus-negative (controls) children shows 80% vac-

cine effectiveness against P[4]G2 strains among infants <1 year of age, in accordance with recently published data from a controlled trial (5). To further elucidate vaccine impact, we are providing support for vaccine effectiveness studies in Nicaragua and El Salvador and conducting strain monitoring before and after licensure throughout Latin America.

**Manish M. Patel,*
Lucia Helena de Oliveira,†
Ana Maria Bispo,†
Jon Gentsch,*
and Umesh D. Parashar***

*Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA; and †Pan American Health Organization, Washington, DC, USA

References

1. Gurgel RQ, Cuevas LE, Vieira SCF, Barros VCF, Fontes PB, Salustino ET, et al. Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1571–3.
2. Glass RI, Parashar UD, Bresee JS, Turcios R, Fischer TK, Widdowson MA, et al. Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *Lancet*. 2006;368:323–32.
3. Desselberger U, Iturriza-Gomara M, Gray JJ. Rotavirus epidemiology and surveillance. *Novartis Found Symp*. 2001;238:125–47.
4. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*. 2005;15:29–56.
5. Vesikari T, Karvonen A, Prymula R, Schuster V, Tejedor JC, Cohen R, et al. Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study. *Lancet*. 2007;370:1757–63.

Address for correspondence: Manish M. Patel, Viral Gastroenteritis Section, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd NE, Mailstop A47, Atlanta, GA 30333, USA; email: aul3@cdc.gov

Article 3

Aranda, C, Sánchez-Seco, MP, Cáceres, F, Escosa, R, Gálvez, JC, Masià, M, Marqués, M, Ruíz, S, Alba, A, Busquets, N, Vázquez, A, Castellà, J, Tenorio, A. 2009. Detection and Monitoring of Mosquito Flaviviruses in Spain between 2001 and 2005. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. Vol 9(2): 171-178.

Detection and Monitoring of Mosquito Flaviviruses in Spain between 2001 and 2005

C. Aranda,^{1,7} M. P. Sánchez-Seco,² F. Cáceres,⁵ R. Escosa,³ J. C. Gálvez,⁵ M. Masià,³ E. Marqués,⁴
S. Ruíz,⁵ A. Alba,⁶ N. Busquets,⁶ A. Vázquez,² J. Castellà,⁷ and A. Tenorio²

Abstract

Between the years 2001 and 2005, a total of 72,895 female mosquitoes were trapped during their season of abundance, and analyzed. They were sorted into 4,723 pools belonging to 20 Culicidae species from the *Anopheles*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Culex*, *Culiseta*, *Coquillettidia*, and *Uranotaenia* genera. The aim was to detect arboviral RNA directly from mosquito homogenates for the genera *Alphavirus*, *Flavivirus*, and *Phlebovirus*. The study formed part of general arbovirus transmission research in four of the most important wetlands in Spain; in the provinces of Girona, Barcelona, Tarragona, and Huelva. The mosquitoes were collected using human bait, CO₂ traps, or light traps, and they were pooled according to date of collection, location, and species. No arboviral RNA from known pathogenic arboviruses was found. However, 111 pools tested positive for unknown mosquito *Flavivirus*, the only genus detected. The *Flavivirus* sequences identified were different from all known *Flavivirus* mosquito viruses, but very close to Kamiti River virus or cell fusing agent virus. The maximum likelihood estimation infection rate (MLE) was calculated for all regions and species. *Aedes albopictus* had the highest MLE at 47.14, followed by *Ae. vexans* with 43.67 (over the entire area). These species were followed by *Culiseta annulata*, with 36.00. The most common species, *Ochlerotatus caspius* and *Culex pipiens*, had low MLE values—0.94 and 0.38, respectively—over the area as a whole.

Key Words: Arbovirus; Mosquitoes; *Aedes*; *Culex*; West Nile

Introduction

THE TRANSMISSION OF ARBOVIRUSES is a major risk factor for the introduction of emerging diseases in different regions around the world, including Europe. However, studies of vector populations in Spain are scarce, especially those related to mosquitoes and arbovirus activity. Because of the geographical position and climate of Spain, autochthonous arboviruses may be in circulation there or non-autochthonous arboviruses may be entering the country via mosquitoes, the movements of infected animals (such as birds), or infected humans.

Arboviruses are grouped in different families and genera. *Flavivirus*, *Alphavirus*, and *Phlebovirus* are three of the most important genera of medical and veterinary importance. Besides the pathogens that exist in these genera, different

viruses of unknown pathogenicity have been described in mosquitoes without a vertebrate host, including cell fusing agent virus (CFA) and Kamiti River virus (KRV) (Cook et al. 2006, Hoshino et al. 2007). Recently, the presence of DNA sequences related to these viruses has been detected integrated in the genomes of some species of mosquitoes (Cammissa-Parks et al. 1992, Crochu et al. 2004, Sang et al. 2003).

From the beginning of the new millennium, the emergence or re-emergence of arbovirus activity has been reported: West Nile virus (WNV) in America and Europe, Usutu virus (USUV) in Africa and Europe, Rift Valley fever virus (RVFV) in the Arabian Peninsula, and Chikungunya virus (CHIKV) in India and on Réunion Island (Esteves et al. 2005, Roehrig et al. 2002, Saxena et al. 2006, Shoemaker et al. 2002, Staikowsky et al. 2006, Weissenböck et al. 2002, Zeller and Shuffenecker 2004). There has even been a very recent epidemic of CHIKV

¹Consell Comarcal del Baix Llobregat, Servei de Control de Mosquits, Barcelona, Spain.

²Servicio de Microbiología Diagnóstica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

³Consorci de Serveis Agroambientals del Baix Ebre i Montsià, Tarragona, Spain.

⁴Mancomunitat Intermunicipal del Servei de Control de Mosquits de la Badia de Roses i Baix Ter, Girona, Spain.

⁵Servicio de Control de Mosquitos, Área de Medio Ambiente, Diputación de Huelva, Huelva, Spain.

⁶Centre de Recerca en Sanitat Animal, Barcelona, Spain.

⁷Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain.

in Italy (Angelini et al. 2007). In different areas of the Mediterranean basin, WNV outbreaks affecting horses and humans have been reported in recent years (Del Giudice et al. 2004, Murgue et al. 2001, Schuffenecker et al. 2005).

In Spain there is evidence of WNV antibodies and antibodies against other flaviviruses that can affect humans in different areas (Lozano and Filipe 1998, Vallés and Sánchez 2000). Recent studies of human sera have shown evidence of WNV infection by detecting WNV IgM and IgG (Bernabeu-Wittel et al. 2007, Bofill et al. 2006). The first case of a neurological disorder caused by this virus has also been described in Spain (Kaptoul et al. 2007). Furthermore, WNV antibodies have recently been detected in several species of wild birds from the most important Spanish wetlands (Figuerola et al. 2007), and Usutu virus sequences have been detected along the Catalan coast (Busquets et al. 2008).

The mosquito species present in Spain and the rest of the Iberian Peninsula are very well documented thanks to studies conducted up until the middle of the twentieth century, when malaria was endemic in this region. In 2000, 54 species of Culicidae were confirmed (Aranda et al. 2000, Eritja et al. 2000). In 2004, *Aedes albopictus* was recorded for the first time in the Iberian Peninsula (Aranda et al. 2006), adding this potentially dangerous vector to the country's list of mosquitoes.

With the aim of obtaining data about the presence of both known and unknown arboviruses in their vectors, a multidisciplinary study was conducted across Spain. In 2001, EVI-TAR, the recently created Spanish Arboviral Diseases Research Network, began monitoring vectors within the framework of general arbovirus transmission. Sera from humans, birds, horses, mosquitoes, and sand flies were sam-

pled up until 2005. In this article, we present the results found in mosquitoes.

Materials and Methods

Between 2001 and 2005, insects belonging to the Culicidae family were collected in a variety of locations in mainland Spanish wetlands during the mosquito season, usually between May and November. Four Spanish Mosquito Control Services (MCS) from Catalonia (NE Spain) and Andalusia (southern Spain) participated in the survey. Each used its own routine mosquito surveillance collections, which included human landings, CO₂ traps, and/or CDC light traps. Mosquitoes were collected and pooled according to date, location, sex, and species. In Catalonia, captures started in 2001 and in Andalusia in 2002.

Localization traps

Three of the wetlands selected for mosquito surveillance are located in the northeast of Spain (*Badia de Roses* in Girona, *Baix Llobregat* in Barcelona, and *Delta de l'Ebre* in Tarragona) and the other is in southwest Spain; in Andalusia (*Marismas del Odiel* and *Doñana* in Huelva) (Fig. 1). All of them are resting areas for migrating birds on the main flyways between Africa and Europe. Mosquitoes are present in selected areas in huge populations. Horses and cattle are also present at the different sites, in sporting facilities or in semi-wild conditions in natural areas.

The *Badia de Roses* is located on the coast, in the province of Girona. It forms a bay which borders on swamps, salt marshes, and lagoons. In this area, four locations were sampled every 2 weeks with CDC light traps (John Hock, USA) that were placed in cow farms and stables.

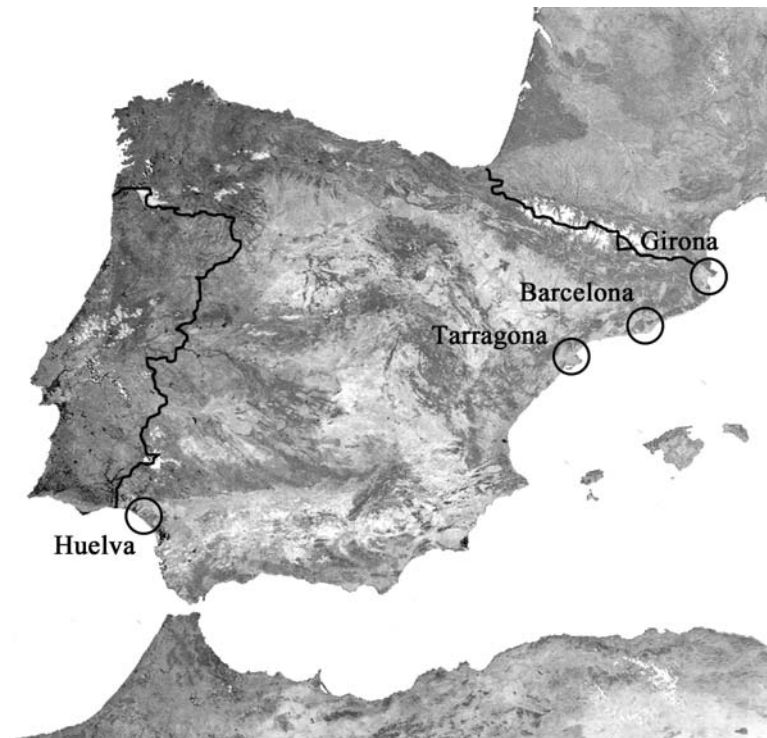


FIG. 1. Map of Spain showing the locations of the different wetlands studied.

The *Baix Llobregat* is located to the south of the city of Barcelona, in the Llobregat river delta, and includes agricultural fields and swamps. Trapping was carried out with EVS CO₂ traps (Bioquip, USA) every 2 weeks at 33 different locations.

The *Delta de l'Ebre* region is located in the province of Tarragona and consists of a delta almost entirely covered by rice fields and areas of swamps and salt marshes. Mosquito samples were obtained weekly at 13 locations by means of human landings made during the 30 minutes after sunset.

In Andalusia, the only existing MCS is located in the province of Huelva, along the tidal salt marshes of the lower reaches of the Guadalquivir River, which include the *Odiel* salt marshes and the National Park of *Doñana*. Here, trapping with CDC light traps was carried out weekly at 10 different locations. The traps were placed before sunset and the mosquitoes were collected the following morning.

Throughout the period of study, most locations were trapped routinely, although some were sampled only occasionally because of specific local conditions, such as meteorological changes or blooms of mosquito populations.

Mosquito collection

Female mosquitoes were captured by the various methods described above and transported to the laboratory under refrigerated conditions. They were immediately sorted and pooled according to species, site, and date of capture. Mosquito species were identified morphologically according to different classification keys (Encinas Grandes 1982, Rioux 1958, Schaffner et al. 2001). They were pooled in 150 μ L of guanidium thiocyanate lysis buffer or in 740 μ L of AVL buffer (Qiagen, USA) in Eppendorff vials, and then frozen.

The maximum pool size was 40 insects. Samples were stored at -30°C and tested for the presence of arboviral RNA.

Virus identification

A multiplex generic reverse transcriptase (RT)-nested-polymerase chain reaction (PCR) followed by sequencing of the amplified products of the virus nucleic acids was used for simultaneous detection and identification of each member of the *Alphavirus*, *Flavivirus*, and *Phlebovirus* genera in a single reaction. Detection and identification of virus RNA was performed as previously described (Sánchez-Seco et al. 2001, 2003, 2005). Briefly, after the extraction of nucleic acids, a mix of generic oligonucleotides is used to amplify each member of the *Flavivirus*, *Alphavirus*, and *Phlebovirus* genera. The retrotranscription is carried out at $38^{\circ}\text{C}/45$ m followed by 40 cycles, ($94^{\circ}\text{C}/30$ s, $40^{\circ}\text{C}/4$ m, $68^{\circ}\text{C}/1$ m 15 s). The nested PCR is also carried out in 40 cycles ($94^{\circ}\text{C}/30$ s, $50^{\circ}\text{C}/4$ m, $72^{\circ}\text{C}/30$ s). MEGA 4 software was used, and phylogenetic trees in which bootstrapping values were calculated with *p* distance and the Neighbor-Joining method were constructed. The amplified fragments were sequenced and compared with those present in databases to identify the agents detected and to study the level of homology.

Results

During the period of study 72,895 female mosquitoes sorted into 4,723 pools belonging to 20 Culicidae species were trapped and analyzed. We obtained five species of *Anopheles*, two *Aedes*, four *Ochlerotatus*, four *Culex*, three *Culista*, one *Coquillettidia*, and one *Uranotaenia* (Table 1).

TABLE 1. MOSQUITOES COLLECTED IN EACH REGION AND THE NUMBER OF POOLS ANALYZED BETWEEN 2001 AND 2005

Species	Huelva		Barcelona		Tarragona		Girona		Total	
	Pools	No	Pools	No	Pools	No	Pools	No	Pools	No
<i>Anopheles algeriensis</i>	13	100							13	100
<i>An. atroparvus</i>	59	517			226	1,035	126	3,294	411	4,846
<i>An. claviger</i>	1	1							1	1
<i>An. maculipennis</i>							1	1	1	1
<i>An. plumbeus</i>	2	9	2	2					4	11
<i>Anopheles sp.</i>			2	2			6	86	8	88
<i>Aedes albopictus</i>			4	15					4	15
<i>Ae. vexans</i>							37	427	37	427
<i>Ochlerotatus caspius</i>	659	22,910	30	260	467	4,092	123	2,556	1,279	29,818
<i>Oc. detritus</i>	236	1,714					9	66	245	1,780
<i>Oc. geniculatus</i>	1	2							1	2
<i>Oc. pulcritarsis</i>			4	5					4	5
<i>Culex modestus</i>	25	95	1	1	313	3,240			339	3,336
<i>Cx. perexiguus</i>	17	47							17	47
<i>Cx. pipiens</i>	642	8,425	639	6,347	87	393	300	8,396	1,668	23,561
<i>Cx. theileri</i>	328	6,672					53	1,266	381	7,938
<i>Culex sp.</i>	29	319							29	319
<i>Culiseta annulata</i>	28	42					6	14	34	56
<i>Cs. longiareolata</i>	29	54	160	359	1	1			190	414
<i>Cs. subochrea</i>	1	1	3	4					4	5
<i>Culiseta sp.</i>	1	1	2	2					3	3
<i>Coquillettidia richiardii</i>	43	113	1	2	5	6			49	121
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	1	1							1	1
Total	2,115	41,023	484	6,999	1,099	8,767	661	16,106	4,723	72,895

TABLE 2. NUMBER OF MOSQUITOES, POSITIVE POOLS, AND MAXIMUM LIKELIHOOD ESTIMATION (MLE)

Species	Huelva			Barcelona			Tarragona			Girona			Complete area			
	No	+	MLE	No	+	MLE	Interval	No	+	MLE	Interval	No	+	MLE	Interval	
<i>Anopheles algeriensis</i>	100											100				
<i>An. atroparous</i>	517							1,035				3,294	1	0.30	0.02-1.46	
<i>An. claviger</i>	1											1				
<i>An. maculipennis</i>	9											1				
<i>An. plumbeus</i>				2								86				
<i>Anopheles sp.</i>				2												
<i>Aedes albopictus</i>				15	1	47.14	4.24-220.20									
<i>Ae. vexans</i>				260	2	7.22	1.45-22.54	4,092	8	1.98	0.93-3.74	2,556	12	4.75	2.66-7.89	
<i>Ochlerotatus caspius</i>	22,910	6	0.26	0.11-0.54								66	1	13.54	0.91-62.43	
<i>Oc. detritus</i>	1,714	1	0.58	0.03-2.79								1,780	2	1.2	0.20-3.62	
<i>Oc. geniculatus</i>	2											2				
<i>Oc. pulcritarsis</i>	95			5								5				
<i>Culex modestus</i>	47			1				3,240				3,336				
<i>Cx. perexiguus</i>												47				
<i>Cx. pipiens</i>	8,425	5	0.59	0.22-1.3	6347			393				8,396	4	0.48	0.16-1.15	
<i>Cx. theileri</i>	6,672	48	8.45	6.47-10.95								1,266	2	1.56	0.29-5.06	
<i>Culex sp.</i>	319											319				
<i>Culiseta annulata</i>	42	2	48.24	8.77-49.36								14				
<i>Cs. longiareolata</i>	54	1	17.94	1.08-82.13	359							414	1	2.41	0.14-11.59	
<i>Cs. subochrea</i>	1				4							5				
<i>Culiseta sp.</i>	1	1			2							3	1	333.33	20.74-833.33	
<i>Coquillettidia richiardii</i>	113	1,000			2			6				121				
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	1											1				
Total	41,023	64	1.60	1.25-2.02	6,999	3	0.43	0.11-1.15	8,767	8	0.92	0.43-1.74	16,106	36	2.26	1.62-3.08
												72,895	111	1.55	1.28-1.86	

No. is the number of collected mosquitoes, + is the number of positive pools, and Interval is the confidence interval for 95%. In the case of *Culiseta sp.* in Huelva, MLE is not applicable, and the value shown corresponds to minimum infection rate (MIR).

Some individuals were only identified by genus because they lacked taxonomic characters. The number of species obtained in each region represented 67% of detected species (in all the different life stages) in Huelva, 47% in Barcelona, 43% in Tarragona, and 43% in Girona. According to the list of Spanish mosquito species, the 20 species collected represent 37% of all species present in the country (Anonymous 1989, Encinas Grandes 1982, Eritja et al. 2000, López Sánchez 1989, Padrós 1997). Taking into account diversity, and using the Simpson's Reciprocal Index 1/D (Simpson 1949), the most varied species collection was obtained in Girona, with a value of 2.89, followed by Tarragona; 2.70, Huelva; 2.61, and finally Barcelona; 1.21. For the entire area studied, the index was 3.44.

The most abundant species was *Oclerotatus caspius* (40.9%), followed by *Culex pipiens* (32.3%), *Cx. theileri* (10.9%), *Anopheles atroparvus* (6.6%), and *Cx. modestus* (4.6%). More than half

(56.3%) of all the mosquitoes captured were captured in Huelva, followed by Girona (22%), Tarragona (12%), and Barcelona (9.6%). Thus Huelva and Girona were the areas in which most mosquitoes were collected.

Sequences of the *Flavivirus* genus were amplified from 111 of the 4723 mosquito pools, as summarized in Table 2. Huelva yielded the most positive pools (64), followed by Girona (36), Tarragona (8), and Barcelona (3). The species with the largest number of positive pools was *Cx. theileri* with 50, followed by *Oc. caspius* with 29, *Ae. vexans* with 16, and *Cx. pipiens* with 9. The rest of the positive species had two or fewer positive pools.

The genomic sequences obtained that belonged to the genus *Flavivirus* differed from those available in databases. Almost all the flaviviruses detected were close to mosquito viruses; grouped near the KRV, CFA, and *Culex* flavivirus (Fig. 2). Two positive pools from Huelva detected in *Oc.*

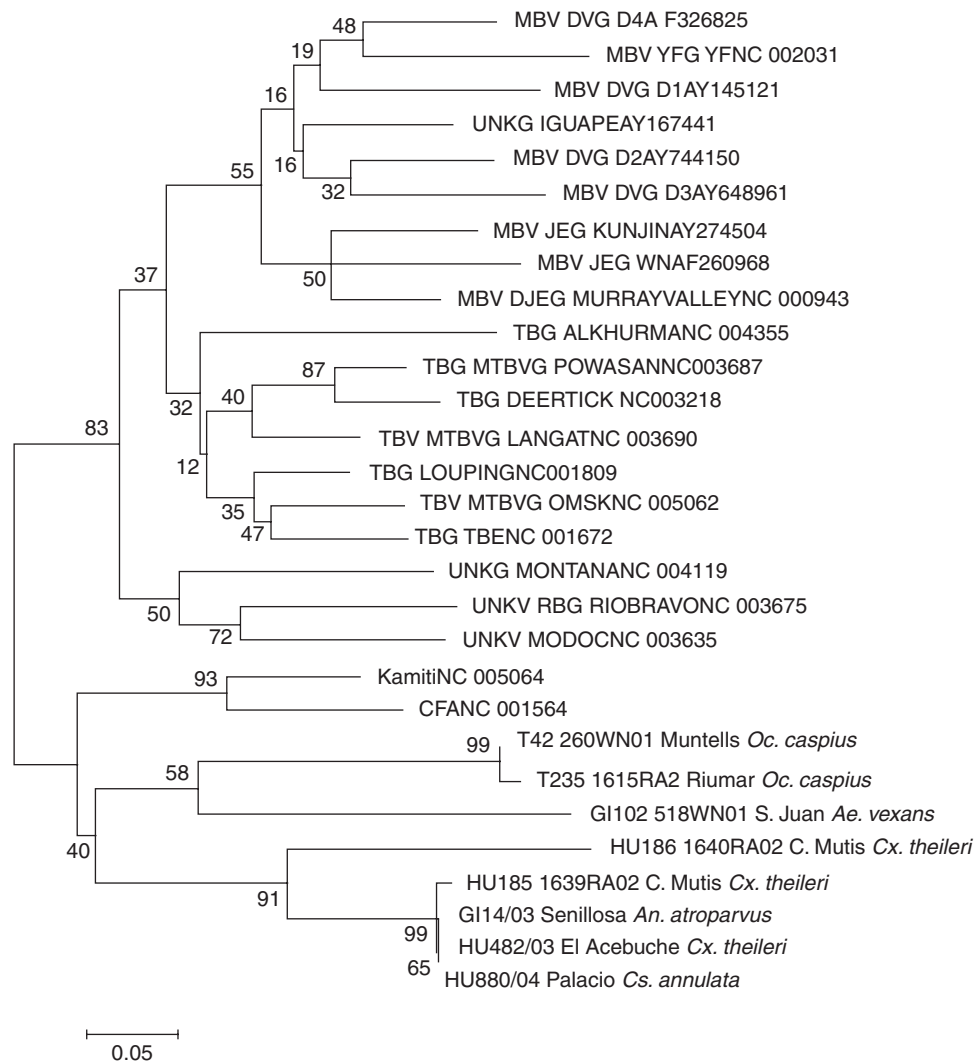


FIG. 2. Phylogenetic tree showing the relationships among the sequences of flaviviruses. A tree was constructed using some representative sequences of the flaviviruses (those available in databases and those found in Spanish mosquitoes). These sequences are similar to cell fusing agent (CFA) virus and Kamiti River virus (KRV) and different to other flaviviruses. Abbreviations: MBV: mosquito-borne virus, TBV: tick-borne virus, UNK: unknown vector, D1: Dengue 1, D2: Dengue 2, D3: Dengue 3, D4: Dengue 4, YF: Yellow Fever, WN: West Nile, JE: Japanese Encephalitis, TBE: Tick-Borne Encephalitis. The abbreviated name of the virus is followed by the accession number. In the case of new viruses, a local code is followed by the place of capture and the species identified.

caspius (one in June 2003 and one in November 2005) were related to mosquito-borne flaviviruses (not shown).

Infection rates were calculated by biased maximum likelihood estimation rates (MLE) with the Poolscreen2 program (Biggerstaff 2004) which uses MLE to calculate the prevalence of infection from the number of positive PCR pools. This method can be applied when the pools are of variable size, and it is particularly appropriate when infection rates are low or medium. (Cupp et al. 2004, Gu et al. 2004). Very small differences were obtained with the minimum infection rate procedure (data not shown). Infectious indices were calculated for each species, region, and year, as shown in Table 2. A linear regression in time of the number of positive pools and the number of mosquitoes captured in the entire area showed a regression coefficient of 0.88 ($p < 0.05$).

Girona was the region with the highest MLE—reaching 2.26—followed by Huelva (1.60), Tarragona (0.92), and Barcelona (0.43). The value for all the regions considered as a whole was 1.55. The genus *Aedes* yielded the highest MLE values: 47.14 for *Ae. albopictus* and 43.67 for *Ae. vexans* calculated for the entire area; this genus was followed by *Culiseta*, with 36.00 for *Culiseta annulata* and 2.41 for *Cs. longiareolata*. The 333.33 result for an unidentified *Culiseta* was considered separately owing to the coincidence of a positive result in the only unidentified *Culiseta* in Huelva. The most common species, *Oc. caspius* and *Cx. pipiens*, had low MLE values—0.94 and 0.38, respectively—over the whole area. *Cx. theileri*, which occupied fourth position in the number of pools analyzed, was the species with the highest number of positive pools (50) and the forth-highest value of MLE (7.20). The only species that gave positive results in every region studied was *Oc. caspius*, and the highest MLE value obtained was 47.14 for *Ae. albopictus* in the *Baix Llobregat* in Barcelona.

Discussion

Mosquitoes collected in the four areas studied harbored flaviviruses not previously described. The presence of positive pools in every zone and with nine different species from five different genera reflects an extensive presence of genomic sequences of viruses in the samples studied. These entomological results represent the first time that mosquitoes have been analyzed in Spain for viruses, although there have been a few studies in humans (Lozano and Filipe 1998).

The species obtained with the different traps represent the most typical and abundant species in each of the wetlands and in Spain as a whole. The most common species throughout all the regions as a whole were *Oc. caspius* and *Cx. pipiens*, which are the main pest mosquitoes in Spain. (Cáceres 2002, Eritja et al. 2000, López Sánchez 1989, Padròs 1997). The samples were most diverse in Girona and Huelva, and they were very homogeneous in Barcelona; probably because the first two wetlands are larger, more diverse, and better protected than the *Baix Llobregat* area in Barcelona (Casado de Otaola and Montes del Olmo 1995).

The use of different methods for mosquito trapping in each area of study did not allow us to make a quantitative comparison among regions. Nevertheless, we can say that the largest numbers of mosquitoes were obtained in the Huelva and Girona wetlands. This is probably a result of the location of the traps in these regions, which were in the vicinity of huge habitats for mosquitoes and of cow farms.

Although more than one hundred pools were found positive for sequences of *Flavivirus*, none of them had been previously described. Most sequences belong to the group of mosquito viruses (Fig. 2). The presence of different viruses such as CFA or KRV in mosquitoes without a vertebrate host is well known, and those viruses have been found in a variety of species and regions including Africa, The Americas, and Japan (Cook et al. 2006, Hoshino et al. 2007). The presence of DNA sequences related to these viruses integrated into the genome of *Aedes* species of mosquitoes has already been described (Crochu et al. 2004), adding more complexity to this heterogeneous group.

The detection of flaviviruses in all the regions in this study shows a common trend, although a higher number of positive pools were detected in Huelva and Girona, which also had the highest MLE for mosquitoes as a whole.

The highest values of positive pools were obtained where most mosquitoes were captured, but not where most traps were placed. In Huelva, with 10 different locations and more than half of the mosquitoes captured, 64 positive pools were obtained, in contrast to the Barcelona wetlands, with 33 different locations and only 3 positive pools.

The species with the highest MLE are not the most common. *Ae. albopictus* had the highest MLE when computed for the complete area at 47.14, followed by *Ae. vexans* (43.67) and *Cs. annulata* (36.00). However, these species occupy the last positions in order of abundance. In contrast, the most common species, *Oc. caspius* and *Cx. pipiens*, had low values of MLE: 0.94 and 0.38, respectively. We obtained most positive pools for *Cx. theileri*, with almost half of the total positives, especially in Huelva where its MLE was 8.45. In contrast *Cx. modestus*, the second most abundant species in wetlands in Tarragona, was always negative despite its role in the transmission of different arboviruses (Hubálek and Halouzka 1999, Lundstrom 1999).

This is the first time that *Ae. albopictus* has been studied in Spain, or the Iberian Peninsula, for arboviruses and the first detection of sequences of flaviviruses since this species was found in the area in 2004 (Aranda et al. 2006). The species' capability of transmitting arboviruses of important human diseases such as WNV, dengue, and chikungunya is well documented (Gratz 2004, Mitchell 1995), and it will be of great interest to continue it is surveillance.

The detection of two positives in Huelva in *Oc. caspius* close to the group of pathogen arboviruses transmitted by mosquitoes is also important. Further studies will be required to clarify their role in disease transmission.

The Girona and Huelva wetlands yielded the highest MLE values, coinciding with the areas with the highest mosquito diversity. *Ae. vexans* (with an MLE of 43.67) was found only in Girona, and *Cs. annulata* (with an MLE of 48.24) was only found positive in Huelva. It is difficult to explain these data because of the unknown role of the flaviviruses found, but together with our other results they suggest that the genera *Aedes* and *Culiseta* (those with the highest MLE values) and the areas in Girona and Huelva are the most promising for studying new flaviviruses.

The presence of an important number of positive pools for unknown mosquito flaviviruses is quite unusual and was probably a factor of the study methods used: multiple generic PCR and detection of all positives for viruses. Identification and comparison of all the positives with databases of

all known arboviruses allowed us to identify positives as not belonging to any known arbovirus.

Research into arboviruses in mosquitoes is useful for the detection of pathogenic viruses or their expansion to new areas. New flaviviruses are constantly being described, and in recent years at least one new virus forming a new evolutionary lineage (Grard et al. 2006) and two new mosquito viruses (Cook et al. 2006, Hoshino et al. 2007) have been described. Constant monitoring and prevention of arboviruses in mosquitoes is necessary in Spain because of the presence of viruses like WNV in Mediterranean Europe and neighboring countries as Portugal, and especially after the outbreak of CHIKV in Italy.

Disclosure Statement

This work received financial support in the form of a grant from the *Fondo de Investigación Sanitaria* of the Spanish *Ministerio de Sanidad y Consumo* as part of the "EVITAR" project.

References

- Angelini, R, Finarely, AC, Angelini, P, Po, C, et al. Chikungunya in north-eastern Italy: a summing up of the outbreak. *Euro Surveill* 2007; 12:E071122.2. Available at: <http://www.eurosurveillance.org/ew/2007/071122.asp#2>. Accessed February 6, 2008.
- Anonymous. Control de les poblacions de mosquits al Baix Llobregat. Barcelona (Spain): Consell Comarcal del Baix Llobregat and MMAMB; 1989.
- Aranda, C, Eritja, R, Schaffner, F, Escosa, R. *Culex (culex) torrentium* Martín (Diptera: Culicidae) a new species from Spain. *Eur Mosq Bull* 2000; 8:7–9.
- Aranda, C, Eritja, R, Roiz, D. First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Med Vet Entomol* 2006; 20:150–152.
- Biggerstaff, B. PoolInfRate, version 2.0. An Excel Add.In to compute infection rates from pooled data. CDC 2004. Available at: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/software.htm>. Accessed February 6, 2008.
- Bernabeu-Wittel, M, Ruiz-Pérez, M, Del Toro, M, Aznar, J, et al. West Nile virus past infections in the general population of Southern Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25:561–565.
- Bofill, D, Domingo, C, Cardenosa, N, Zaragoza, J, et al. Human West Nile virus infection, Catalonia, Spain. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:1163–1164.
- Busquets, N, Alba, A, Allepuz, A, Aranda, C, et al. Usutu virus sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:861–863.
- Cáceres, F. Bases Técnicas para el Control de Mosquitos de la Costa de Huelva. Sevilla (Spain). Universidad de Sevilla. Doctoral Tesis. 2002.
- Cammisa-Parks, H, Cisar, LA, Kane, A, Stollar, V. The complete nucleotide sequence of cell fusing agent (CFA): homology between the nonstructural proteins encoded by CFA and the nonstructural proteins encoded by arthropod-borne flaviviruses. *Virology* 1992; 189:511–524.
- Casado de Otaola, S, Montes del Olmo, C. *Guía de los Lagos y Humedales de España*. Madrid (Spain): Revero Editores; 1995.
- Cook, S, Bennett, SN, Holmes, EC, De Chesse, R, et al. Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *J Gen Virol* 2006; 87:735–748.
- Crochu, S, Cook, S, Attoui, H, Charrel, RN, et al. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *J Gen Virol* 2004; 85:1971–1980.
- Cupp, EW, Tennessen, KJ, Oldland, WK, Hassan, HK, et al. Mosquito and arbovirus activity during 1997–2002 in a wetland in northeastern Mississippi. *J Med Entomol* 2004; 41:495–501.
- Del Giudice, P, Schuffenecker, I, Vandebos, F, Counillon, E, et al. Human West Nile virus, France. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:1885–1886.
- Encinas Grandes, A. *Taxonomía y biología de los mosquitos del Área salmantina, Salamanca (Spain)*: CSIC. Universidad de Salamanca; 1982.
- Eritja, R, Aranda, C, Padrós, J, Goula, M, et al. An annotated checklist and bibliography of the mosquitoes of Spain (Diptera: Culicidae). *Eur Mosq Bull* 2000; 8:10–18.
- Esteves, AA, Almeida, PG, Galao, RP, Piedade, L, et al. West Nile virus in southern Portugal, 2004. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2005; 5:410–413.
- Figuerola, J, Soriguer, R, Rojo, G, Tejedor, CG, et al. Seroconversion in wild birds and local circulation of West Nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:1915–1917.
- Gu, W, Lampman, R, Novak, RJ. Assessment of arbovirus vector infection rates using variable size pooling. *Med Vet Entomol* 2004; 18:200–204.
- Grard, G, Lemasson, JJ, Sylla, M, Dubot, A, et al. Ngoye virus: a novel evolutionary lineage within the genus *Flavivirus*. *J Gen Virol* 2006; 87:3273–3277.
- Gratz, NG. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol* 2004; 18:215–227.
- Hoshino, K, Isawa, H, Tsuda, Y, Yano, K, et al. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology* 2007; 359:405–414.
- Hubálek, Z, Halouzka, J. West Nile fever—a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis* 1999; 5:643–650.
- Kaptoul, D, Viladrich, P, Domingo, C, Niubó, J, et al. West Nile virus in Spain: report of the first diagnosed case (in Spain) in a human with aseptic meningitis. *Scand J Infect Dis* 2007; 39:70–71.
- López Sánchez, S. 1989. Control integral de mosquitos en Huelva. Junta de Andalucía. Sevilla. 340 ppp.
- Lozano, A, Filipe, AR. Anticuerpos frente a virus West Nile y otros virus transmitidos por artrópodos en la población del Delta del Ebro. *Rev Esp Salud Pública*. 1998; May–Jun:245–250.
- Lundstrom, J. Mosquito-borne viruses in Western Europe: a review. *J Vect Ecol* 1999; 24:1–39.
- Mitchell, CJ. The role of *Aedes albopictus* as an arbovirus vector. *Parassitologia* 1995; 37:109–113.
- Murgue, B, Murri, S, Zientara, S, Durand, B, et al. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:692–696.
- Padrós, J. *Culicids del Baix Llobregat (Diptera: Culicidae) Faunística i Biologia*. Barcelona (Spain): University of Barcelona; 1997.
- Rioux, JA. *Les Culicides du "Midi" Méditerranéen*. Paris: Paul Lechevalier; 1958.
- Roehrig, JT, Layton, M, Smith, P, Campbell, GL, et al. The emergence of West Nile virus in North America: ecology, epidemiology, and surveillance. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 267:223–240.
- Sánchez-Seco, MP, Rosario, D, Quiroz, E, Guzmán, G, et al. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the *Alphavirus* genus. *J Virol Methods* 2001; 95:153–161.

- Sánchez-Seco, MP, Echevarría, JM, Hernández, L, Estévez, D, et al. Detection and identification of Toscana and other phleboviruses by RT-nested-PCR assays with degenerated primers. *J Med Virol* 2003; 71:140–149.
- Sánchez-Seco, MP, Rosario, D, Domingo, C, Hernández, L, et al. A Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J Virol Methods* 2005; 126:101–109.
- Sang, RC, Gichogo, A, Gachoya, J, Dunster, MD, et al. Isolation of a new flavivirus related to cell fusing agent virus (CFAV) from field-collected flood-water *Aedes* mosquitoes sampled from a dambo in central Kenya. *Arch Virol* 2003; 148:1085–1093.
- Saxena, SK, Singh, M, Mishra, N, Lakshmi, V. Resurgence of Chikungunya virus in India: an emerging threat. *Euro Surveill*. 2006 Aug 10; 11:E060810.2. Available at: <http://www.eurosurveillance.org/ew/2006/060810.asp#2>. Accessed February 6, 2008.
- Shoemaker, T, Boulianne, C, Vincent, MJ, Pezzanite L, et al. Genetic analysis of viruses associated with emergence of Rift Valley fever in Saudi Arabia and Yemen, 2000–01. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:1415–1420.
- Simpson, H. Measurement of diversity. *Nature* 1949; 163:688.
- Schaffner, E, Angel, G, Geoffroy, B, Hervy, JP, et al. *The Mosquitoes of Europe*. [CD-ROM] Paris: IRD editions; 2001.
- Schuffenecker, I, Peyrefitte, CN, el Harrak, M, Murri, S, et al. West Nile virus in Morocco, 2003. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:306–309.
- Staikowsky, F, Pinar, A, Cand, E, Grivard, P, et al. Chikungunya à l'île de la Réunion. Retour d'expérience d'une crise sanitaire au sein d'un service d'urgence [The infection by the virus Chikungunya: an emergent disease in Réunion Island]. *Eur J Emerg Med* 2006; 13:A7–A8 (in French).
- Vallés, X, Sánchez, F. West Nile virus: el virus de la fiebre del Oeste del Nilo. *Enf Emerg* 2000; 2: 232–238.
- Weissenböck, H, Kolodziejek, J, Url, A, Lussy, H, et al. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne Flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:652–656.
- Zeller, HG, Schuffenecker, I. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23:147–156.

Address reprint requests to:

Dr. Carlos Aranda

Servei de Control de Mosquits

Consell Comarcal del Baix Llobregat

Parc Torreblanca, CN 340 s/n

Sant Feliu de Llobregat 08980

Spain

E-mail: caranda@lbaixllobregat.net

Article 4

Sánchez-Seco, MP, Vázquez, A, Collao, X, Hernández, L, Aranda, C, Ruiz, S, Escosa, R, Marqués, E, Bustillo, MA, Molero, F, Tenorio, A. Surveillance of Arboviruses in Spanish Wetlands: Detection of New Flavi- and Phleboviruses. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. Accepted 13/03/2009. Ahead of print. doi:10.1089/vbz.2008.0188.

Surveillance of Arboviruses in Spanish Wetlands: Detection of New Flavi- and Phleboviruses

María-Paz Sánchez-Seco,^{1,2} Ana Vázquez,¹ Ximena Collao,^{1,3} Lourdes Hernández,¹
Carles Aranda,^{4,5} Santiago Ruiz,⁶ Raul Escosa,⁷ Eduard Marqués,⁸ María-Angeles Bustillo,¹
Francisca Molero,¹ and Antonio Tenorio¹

Abstract

The presence of viruses in arthropods in Spain has been studied over 5 years. Flaviviruses similar to cell-fusing agent, sequences of a flavivirus related to those transmitted by mosquitoes, and a phlebovirus similar to Naples and Toscana viruses were detected. Their potential human or animal pathogenicity should be studied.

Key Words: Arboviruses—Flaviviruses—Generic PCR—Phleboviruses—Surveillance.

FLAIVIRUS, PHLEBOVIRUS, AND ALPHAVIRUS genera contain numerous and important human and/or veterinary pathogens as well as many viruses with unknown pathogenicity. Toscana virus (TOSV) is endemic in Spain, and West Nile virus was recently isolated in the center of the country (Höfle et al. 2008).

With the aim of obtaining more data about arboviruses a multidisciplinary study was conducted in Spain and arboviruses were searched for within their vectors. We used a multiplex and generic RT-nested-PCR that is the result of the combination of three simple generic reactions for the detection of alphaviruses, phleboviruses, and flaviviruses (Sánchez-Seco et al. 2001, 2003, 2005). The method has been assayed with Chikungunya, Ross River, Venezuelan Equine Encephalitis (alphaviruses), TOSV (phleboviruses), West Nile virus, Dengue 1–4, Saint Louis, and Tick-borne encephalitis (flaviviruses) viruses. The limit of detection was determined using plasmids containing DNA target sequences for a member of each of the amplified genera and was about 100 copies for phlebovirus detection and 10 for alphavirus and also for flavivirus amplification.

Mosquitoes and sandflies from Catalonia, Northeastern Spain, from 2001 to 2004, and Andalusia, Southwestern Spain, from 2002 to 2005, were captured (Aranda et al. 2008). After classification they were pooled in a lysis buffer, and nucleic acids were extracted and analyzed. At the end of 2005, minor modifications, mainly using EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium; Sigma, St. Louis, MO), in collecting samples in Southwestern Spain were carried out to try viral isolation in Vero and C6–36 cells. A total of 4300 pools were analyzed and 107 tested positive for different arboviruses. Of them, 102 (94 pools of mosquitoes and 8 of sandflies) rendered a band corresponding to that observed in flavivirus amplification. Positive amplification for phleboviruses was obtained in five pools of sandflies from Catalonia.

The topology of the tree obtained with the sequences shows that these viruses are distributed among four main groups (mosquito-borne and tick-borne viruses, viruses with unknown vector, and mosquito viruses) (Fig. 1A), as previously known, and analysis of almost the complete *NS5* gene is in agreement with this result (Dr. Ana Vázquez, personal communication). The sequences of two pools (HU566/03 and HU205/05), from

¹Unit of Alert and Emergency, Laboratory of Arboviruses and Imported Viral Diseases, National Center for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

²Laboratory of Arboviruses and Imported Viral Diseases, National Center for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

³Service of Microbiology, Valparaíso University, Valparaíso, Chile.

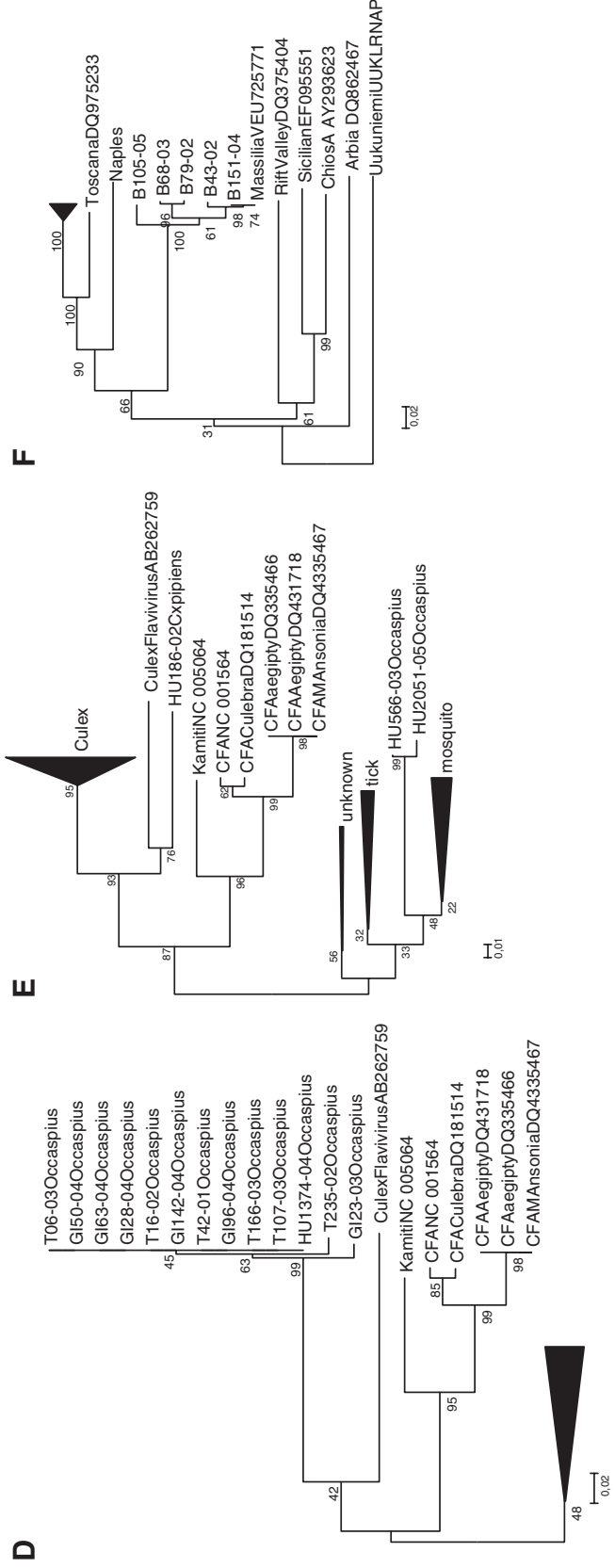
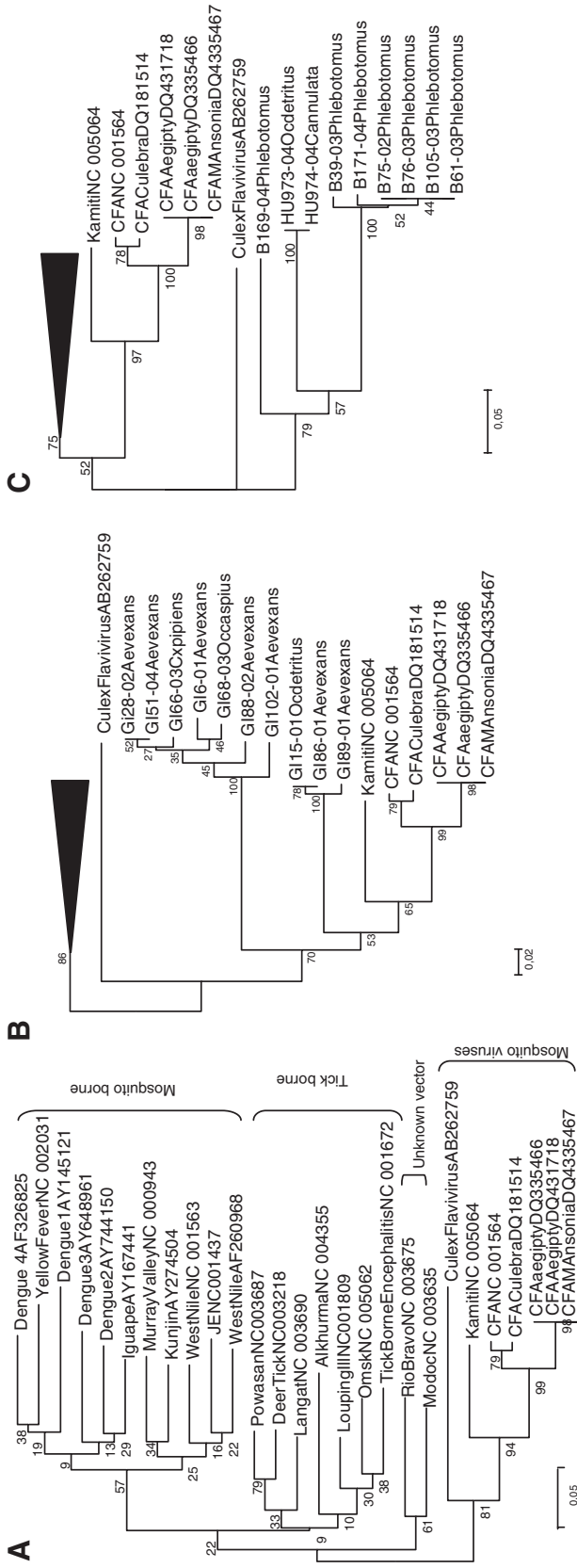
⁴Service of Mosquito Control (Baix Llobregat), Barcelona, Spain.

⁵Department of Sanity and Animal Anatomy, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain.

⁶Service of Mosquito Control, Huelva, Spain.

⁷Service of Mosquito Control (Delta del Ebro), Tarragona, Spain.

⁸Service of Mosquito Control (Bahía de Rosas), Gerona, Spain.



Andalusia, are of special interest because they seem to group with the arthropod-borne flaviviruses (Fig. 1E).

The other positive pools are related to mosquito flaviviruses (cell-fusing agent [CFA], Kamiti River virus [KRV], and *Culex* Flavivirus) (Fig. 1B–E). Within them, a group more related to CFA and KRV, mainly present in *Aedes vexans*, has been detected (Fig. 1B). The most abundant and heterogeneous group, with a wide geographic and temporal distribution, is mainly formed by *Culex* mosquitoes and is related to *Culex* Flavivirus (Fig. 1E). *Ochlerotatus caspius*-positive pools are present in every group although several pools of *Oc. caspius* form a specific cluster (Fig. 1D). The last group is formed by some species of mosquitoes and also sandflies (Fig. 1C). Flaviviruses in *Aedes* mosquitoes have been described in Africa (CFA and KRV), South America (Culebra strain, a variant of CFA), and Europe (this article) (Sang et al. 2003, Cook et al. 2006). Recently, Hoshino et al. (2007) have described a variant of CFA obtained in Japan from *Culex* mosquitoes, and now we have another variant in Europe (this article). This close association between flaviviruses and their vectors requires deeper studies to establish potential biological advantages for the viruses.

Along with the growing number of new mosquito flaviviruses, the presence of CFA-related sequences integrated in the genome of *Aedes* mosquitoes (CSA; Cell Silent Agent) has recently been described (Crochu et al. 2004). To assure that positive pools were the result of RNA amplification, we used RNase A (Sigma) in some extracts that were directly amplified without the previous retro-transcription step. The results for flaviviruses show that some sequences correspond to RNA and other to DNA. In the *Culex* group, six of seven assayed pools were RNA, in the *Ochlerotatus* three of nine were DNA, in *Phlebotomus* five of five were RNA, and in the *Aedes* group five out of five were DNA. We also assayed the pools related to mosquito-borne viruses, and the amplification was due to an RNA target. So, most of the sequences we obtained do not correspond to DNA amplification although we amplified DNA sequences when *Aedes* mosquitoes (where the integration phenomenon seems to be more frequent) were the vectors. In *Ochlerotatus* (previously, part of the *Aedes* genus) DNA, as well as RNA, amplification has also been detected. Taken together, it seems that flavi-

viruses, not CSA-like sequences, are present in most of our mosquitoes. However, isolation in cultured cells is needed to confirm viral presence; therefore, with this aim three positive pools from the most abundant *Culex* group were used for viral isolation. Three to five blind passages were carried out. Cytopathic effect was observed at 5–6 dpi (days post-infection) in every pass in C6–36 but not in Vero cells. To assure that the effect was due to infection, the supernatants were assayed by RT-nested-PCR, and positive amplification from 1 dpi was obtained in all the passes in C6–36 and not in Vero cells; so, viruses from pools of *Culex* mosquitoes have been isolated.

The sequences of the detected phleboviruses were also different from those available in databases with the exception of a phlebovirus, named Massilia virus, recently sequenced by Charrel and coworkers (2008), which has been detected in sandflies captured in France (Fig. 1F) and whose implications for public health are unknown. They belong to one cluster that is related to the viruses belonging to the Naples complex (TOSV and Naples serotypes). It seems that the new virus has a wide distribution, because it has been detected in Catalonia and France and it has also been detected and isolated in the Southeastern region of Spain (Dr. Sara Sambonmatsu, personal communication).

Further studies are being carried out to obtain more data and determine if the new viruses infect animals or humans, and if so whether they represent a potential threat to human or veterinary health, as well as their role in the evolution of these genera.

Acknowledgments

The authors thank Domingo Estévez and Teresa de Miguel for their technical assistance. Dr. Inmaculada Casas and all the members of the Red EVITAR (Enfermedades Víricas Transmítidas por Artrópodos y Roedores), a multidisciplinary group founded by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) (Spanish Ministry of Health) (G03/059), provided invaluable advice and help. All the authors were members of this network. This project has been partially funded by the projects of the FIS numbered 98/0229 and G03/059 and by grants from the Spanish Ministry of Defence.

FIG. 1. Identification of sequences. Bootstrap consensus trees showing the relationships between the sequences of nucleotides detected in this paper and those available from databases were constructed using the p-distance option with the Neighbour Joining method in the MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) 4 software. Sequences from databases are shown with the accession number following their names. Those obtained in this study are named with an internal code corresponding to the Wetland (HU: Andalusia, GI; B and T: Catalonia), the year of capture and the species (*Ae*, *Aedes*; *Oc*, *Ochlerotatus*; *C*, *Culiseta*; *Cx*, *Culex*). (A) Sequences of flaviviruses obtained from databases used in this study. (B) Sequences used in (A) plus the ones of the “*Aedes* group.” (C) Sequences used in (A) plus the ones of the “*Phlebotomus* group.” (D) Sequences used in (A) plus the ones of the “*Ochlerotatus* group.” (E) Sequences used in (A) plus the ones of the “*Culex* group” (*Culex theileri*: HU185-02, HU348-03, HU405-03, HU423-03, HU482-03, HU554-03, HU584-03, HU586-03, HU595-03, HU596-03, HU602-03, HU610-03, HU743-03, HU745-03, HU787-03, HU818-03, HU836-03, HU846-03, GI93-04, GI86-04, HU879-04, HU902-04, HU932-04, HU945-04, HU947-04, HU963-04, HU967-04, HU972-04, HU984-04, HU986-04, HU999-04, HU1021-04, HU1023-04, HU1025-04, HU1060-04, HU1066-04, HU1073-04, HU1111-04, HU1121-04, HU1144-04, HU1148-04, HU1156-04, HU1177-04, HU1183-04, HU1184-04, HU1488-05, HU1714-05, HU1749-05, HU1884-05, HU1992-05, HU2100-05, and HU2131-05; *Culex pipiens*: HU186-02, HU617-03, GI38-03, HU1377-04, GI82-04, and GI19-04; *Ochlerotatus caspius*: HU987-04 and HU1165-04; *C. spp.*: HU988-04; *C. annulata*: HU880-04; *C. longiareolata*: HU1098-04; *Anopheles atroparvus*: GI14-03A; *Phlebotomus*: HU1895-05) and those related to the mosquito borne viruses. (F) Sequences of phleboviruses that include Toscana virus isolates of Spanish genotype (STI1 to 11, Sambonmatsu et al. 2005; ESH 62100, EsPhGR40, and H/MTSSA, Collao et al., EID, 2009).

References

- Aranda, C, Sánchez-Seco, MP, Cáceres, F, Escosa, R, et al. Detection and monitoring of mosquito flaviviruses in Spain between 2001 and 2005. *Vector Borne Zoonot Dis* 2009; 9: 171–178.
- Charrel, RN, Moureau, G, Temmam, S, Izri, A, et al. Massilia virus, a novel phlebovirus (Bunyaviridae) isolated from sandflies in the Mediterranean. *Vector Borne Zoonot Dis* 2008; Epub ahead of print.
- Collao, X, Palacios, G, Sanbonmatsu-Gomez, S, Perez-Ruiz, M, et al. Genetic diversity of Toscana virus. *EID* 2009; 15:574–577.
- Cook, S, Bennett, SN, Holmes, EC, De Chesse, R, et al. Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *J Gen Virol* 2006; 87:735–748.
- Crochu, S, Cook, S, Attoui, H, Charrel, RN, et al. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *J Gen Virol* 2004; 85:1971–1980.
- Höfle, U, Blanco, JM, Crespo, E, Naranjo, V, et al. West Nile virus in the endangered Spanish imperial eagle. *Vet Microbiol* 2008; 129:171–178.
- Hoshino, K, Isawa, H, Tsuda, Y, Yano, K, et al. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology* 2007; 359:405–414.
- Sanbonmatsu-Gomez, S, Perez-Ruiz, M, Collao, X, Sanchez-Seco, MP, et al. Toscana virus in Spain. *EID* 2005; 11:1701–1707.
- Sánchez-Seco, MP, Echevarria, JM, Hernandez, L, Estevez, D, et al. Detection and identification of TOSV and other phleboviruses by RT-nested-PCR assays with degenerated primers. *J Med Virol* 2003; 71:140–149.
- Sánchez-Seco, MP, Rosario, D, Domingo, C, Hernandez, L, et al. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J Virol Methods* 2005; 126:101–109.
- Sánchez-Seco, MP, Rosario, D, Quiroz, E, Guzmán, G, Tenorio, A. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *J Virol Methods* 2001; 95:153–161.
- Sang, RC, Gichogo, A, Gachoya, J, Dunster, MD, et al. Isolation of a new flavivirus related to cell fusing agent virus (CFAV) from field-collected flood-water *Aedes* mosquitoes sampled from a dambo in central Kenya. *Arch Virol* 2003; 148:1085–1093.

Address reprint requests to:

Maria Paz Sánchez-Seco
Laboratory of Arboviruses and Imported Viral Diseases
National Center for Microbiology
Instituto de Salud Carlos III
Majadahonda 28220
Madrid
Spain

E-mail: paz.sanchez@isciii.es

RESUM DE RESULTATS I DE DISCUSSIÓ

Entre els anys 2001 i 2005 es van capturar i analitzar 72.895 femelles de mosquits i 6.871 de flebòtoms el les estacions d'abundància amb l'objectiu de detectar la presència de genoma d'arbovirus en diferents àrees d'Espanya, en especial en zones humides, habitualment entre maig i novembre. Es van analitzar homogenats dels vectors per detectar directament ARN d'arbovirus dels gèneres *Alphavirus*, *Flavivirus*, i *Phlebovirus*. Aquest estudi forma part d'un de més general de transmissió d'arbovirus en el qual també es va recollir mostres d'aus, cavalls i humans en quatre dels aiguamolls d'Espanya més importants, a Girona, Barcelona, Tarragona i Huelva.

Els insectes es van recollits amb esquer humà, trampes de CO₂ i trampes CDC i es van agrupar en pools segons la data de captura, la localitat i l'espècie.

Pel que fa als flebòtoms, les mostres es van obtenir a partir de 2002 a Barcelona i Huelva i no es van identificar a nivell d'espècie.

Els culícids es van agrupar en 4.723 pools. Pertanyien a 20 espècies dels gèneres *Anopheles*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Culex*, *Culiseta*, *Coquillettidia*, i *Uranotaenia*. Els flebòtoms es van agrupar en 236 pools com a subfamília.

Detecció del mosquit tigre (*Aedes albopictus*)

Mentre es duia a terme l'estudi, l'autor d'aquesta tesi va detectar el mosquit invasor, *Ae. albopictus*, per primera vegada a Espanya, concretament a Sant Cugat del Vallès, el 9 d'agost del 2004. Aquesta ciutat adjacent a Barcelona té un clima típicament mediterrani amb una temperatura mínima mitjana de 10,2 °C i una mitjana de precipitacions anuals de 605 mm. En el transcurs d'una inspecció motivada per molèsties d'insectes picadors es va recollir amb aspirador entomològic un mascle de culícid en un jardí privat i una col·lecció de larves en un forat d'arbre d'una soca de pollancre en un parc públic. Al laboratori es va identificar el mascle amb les claus de classificació de Schaffner et al, 2001, com a pertanyent a *Ae. albopictus*, i un altre mascle que va emergir d'una de les larves obtingudes. Mitjançant inspeccions dutes a terme en els dies següents es va confirmar l'existència d'importants nuclis de poblacions d'aquesta espècie, atès que es van trobar adults, larves i pupes per gran part del municipi. Es van analitzar totes les femelles capturades en la campanya de vigilància d'arbovirus i a l'àrea d'estudi.

Aquesta és la primera vegada que es detecta l'*Ae. albopictus* a Espanya i a la península Ibèrica i també és la primera vegada que s'analitzen mostres d'aquesta espècie per detectar arbovirus a Espanya.

Culícids

El nombre d'espècies de mosquit que s'ha obtingut en les mostres recollides a cada regió representa el 67 % de les espècies detectades a Huelva, el 47 % a Barcelona, el 43 % a Tarragona i el 43 % a Girona i, segons el llistat d'espècies trobades a Espanya, representen el 37 % de les espècies detectades al país (Encinas Grandes, 1982, Anònim, 1989, López Sánchez, 1989, Padrós, 1997, Eritja et al, 2000, Cáceres, 2002). Tenint en compte que el nombre d'espècies detectades inclou tant si ho van ser com a larves o com a adults i que una gran part es poden considerar rares o molt rares, els valors obtinguts reflecteixen la culicidofauna majoritària de cada zona, incloent-hi les espècies que causen més molèsties. En el conjunt de l'estudi, l'espècie més abundant va ser *Oc. caspius* (40,9 %), seguida de *Cx. pipiens* (32,3 %), *Cx. theileri* (10,9 %), *An. atroparvus* (6,6 %), i *Cx. modestus* (4,6 %) que són, de fet, les espècies que més molèsties causen a Espanya. El 56,3 % dels mosquits es va capturar a Huelva, seguit pel 22 % a Girona, el 12 % a Tarragona i el 9,6 % a Barcelona (Taula 1).

Espècies	Huelva		Barcelona		Tarragona		Girona		Àrea total	
	Pools	Nre.	Pools	Nre.	Pools	Nre.	Pools	Nre.	Pools	Nre.
<i>Anopheles algeriensis</i>	13	100							13	100
<i>An. atroparvus</i>	59	517			226	1.035	126	3.294	411	4.846
<i>An. claviger</i>	1	1							1	1
<i>An. maculipennis</i>							1	1	1	1
<i>An. plumbeus</i>	2	9	2	2					4	11
<i>Anopheles sp.</i>			2	2			6	86	8	88
<i>Aedes albopictus</i>			4	15					4	15
<i>Ae. vexans</i>							37	427	37	427
<i>Ochlerotatus caspius</i>	659	22.910	30	260	467	4.092	123	2.556	1.279	29.818
<i>Oc. detritus</i>	236	1714					9	66	245	1.780
<i>Oc. geniculatus</i>	1	2							1	2
<i>Oc. pulcritarsis</i>			4	5					4	5
<i>Culex modestus</i>	25	95	1	1	313	3.240			339	3.336
<i>Cx. perexiguus</i>	17	47							17	47
<i>Cx. pipiens</i>	642	8.425	639	6.347	87	393	300	8.396	1.668	23.561
<i>Cx. theileri</i>	328	6.672					53	1.266	381	7.938
<i>Culex sp.</i>	29	319							29	319
<i>Culiseta annulata</i>	28	42					6	14	34	56
<i>Cs. longiareolata</i>	29	54	160	359	1	1			190	414
<i>Cs. subochrea</i>	1	1	3	4					4	5
<i>Culiseta sp.</i>	1	1	2	2					3	3
<i>Coquillettidia richiardii</i>	43	113	1	2	5	6			49	121
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	1	1							1	1
Total	2.115	41.023	848	6.999	1.099	8.767	661	16.106	4.723	72.895

Taula 1. Mosquits capturats per regió i nombre de pools analitzats entre 2001 i 2005.

L'ús de metodologies molt diverses per capturar els mosquits no permet de fer una anàlisi quantitativa respecte d'això, però sí que es pot afirmar que el nombre més gran de mosquits capturats es va aconseguir a Huelva i a Girona, probablement per la localització de les trames en aquestes àrees, en l'entorn immediat d'enormes hàbitats de mosquits i en granges de bovins.

Pel que fa a diversitat, i aplicant l'índex recíproc de Simpson 1/D (Simpson, 1949), la diversitat més gran es va obtenir a Girona, amb un valor de 2,89, seguit de Tarragona (2,7), Huelva (2,6) i Barcelona (1,21). Per al total de la zona va ser de 3,44.

Es van analitzar homogenats dels culícids per detectar directament ARN d'arbovirus dels gèneres *Alphavirus*, *Flavivirus* i *Phlebovirus*. S'han amplificat seqüències pròpies del gènere *Flavivirus* en 111 dels pools de mosquits analitzats. Huelva va ser la regió amb més positius (64), seguida de Girona (36), Tarragona (8) i Barcelona (3). No s'ha trobat ARN d'arbovirus patògens que coincideixin amb els coneguts en les bases de dades disponibles. Per als culícids, els pools positius ho van ser a *Flavivirus* desconeguts, l'únic gènere detectat en aquest grup taxonòmic. Les seqüències de *Flavivirus* identificats són diferents de qualsevol *Flavivirus* virus de mosquit conegut, però properes al KRV o al CFA, excepte en el cas de dues mostres d'*Oc. caspius* de Huelva, que es poden situar en el grup de virus transmesos per artròpodes (Fig. 7).

L'espècie amb més pools positius va ser *Cx. theileri*, amb 50, seguida d'*Oc. caspius*, amb 29, *Ae. vexans*, amb 16 i *Cx. pipiens*, amb 9. La resta d'espècies va tenir 2 positius o menys: *Ochlerotatus detritus* 2, *Cs. annulata* 2, *An. atroparvus* 1, *Ae. albopictus* 1, *Cs. longiareolata* 1 i *Culiseta sp.* 1.

L'única espècie que va mostrar positius a totes les àrees estudiades va ser *Oc. caspius*. Huelva va ser la regió amb més espècies amb positius (6 espècies i 1 *Culiseta* no identificada) seguida de Girona amb 3, Barcelona amb 2 i Tarragona amb 1.

La regressió lineal segons el nombre de pools positius i el nombre de mosquits capturats a la totalitat de l'àrea va mostrar un coeficient de 0,88 ($P < 0,05$).

Per a totes les zones i espècies, es va calcular l'estimació del màxim de versemblança de la taxa d'infecció -*the maximum likelihood estimation infection rate*- (MLE) amb el programa Poolscreen2 (Biggerstaff, 2004), que obté la prevalença d'infecció a partir del nombre de PCR positives. Les taxes d'infecció es van calcular per a cada espècie, regió i any.

Les espècies amb valors MLE més elevats no són les més comunes i ocupen les darreres posicions en ordre d'abundància. *Ae. albopictus*, capturat únicament al Baix Llobregat (Barcelona), va tenir la MLE més alta (47,14), seguida per *Ae. vexans* amb 43,67 per al conjunt de l'àrea d'estudi. Per sota d'aquestes espècies es troba *Cs. annulata*, amb 36,00, i *Cs. longiareolata*, amb 2,41. Cal considerar amb precaució el valor de 333,33 per a una espècie no identificada de *Culiseta*, ja que va coincidir amb un positiu en l'única *Culiseta* no identificada a Huelva. Les espècies més abundants, *Oc. caspius* i *Cx. pipiens*, van obtenir valors MLE baixos -0,94 i 0,38, respectivament- en el conjunt de tota l'àrea (Taula 2).

Els mosquits recollits a les quatre àrees estudiades van mostrar genoma d'arbovirus no descrits prèviament. Aquests resultats representen la primera vegada que s'estudien virus en mosquits a Espanya, malgrat que ja hi havia hagut amb anterioritat algun estudi en humans (Lozano and Filipe, 1998). La presència de virus com el CFA o el KRV en mosquits sense un hoste vertebrat és prou coneguda i s'ha trobat en una varietat de regions que inclou l'Àfrica, Amèrica i el Japó (Cook et al, 2006, Hoshino et al, 2007). D'altra banda, també s'ha descrit durant el desenvolupament del període de la present tesi, la presència de seqüències d'ADN relacionades amb aquests virus i integrades en el genoma d'espècies del gènere *Aedes* (Crochu et al, 2004), de manera que s'ha afegit encara més complexitat a aquest grup.

Els valors més elevats de pools positius es van obtenir on es van capturar més mosquits i no on es van posar més trapes. A Huelva, amb 10 localitats, es van capturar més de la meitat dels mosquits amb 64 pools positius, mentre que a Barcelona, amb 33 localitats només s'hi van trobar 3 pools positius.

Una gran part dels positius es va obtenir de pools de *Cx. theileri*, especialment a Huelva, amb quasi la meitat del total de positius. D'altra banda, *Cx. modestus*, l'espècie més abundant a Tarragona, va ser negativa malgrat el seu paper en la transmissió de diferents arbovirus (Hubálek i Halouzka, 1999, Lundström, 1999). Cal assenyalar que la detecció de dos positius a Huelva i en *Oc. caspius*, propers al grup d'arbovirus patògens transmesos per mosquits, és rellevant i caldrà continuar el seu estudi.

És inusual la presència d'un important nombre de positius de *Flavivirus* desconeguts. Aquesta pot ser deguda al mètode utilitzat, una PCR genèrica i múltiple i a l'estudi posterior de tots els positius. Contínuament es descriuen nous *Flavivirus* i així, recentment s'ha descrit un nou virus, el Ngoye virus, el qual ha format un nou llinatge (Grard et al, 2006) i dos nous virus de mosquits, el Culebra i CxFV (Cook et al, 2006, Hoshino et al, 2007).

Resum de resultats i de discussió

Espècies	Huelva				Barcelona				Tarragona				Girona				Àrea total			
	Nre.	+	MLE	Interval	Nre.	+	MLE	Interval	Nre.	+	MLE	Interval	Nre.	+	MLE	Interval	Nre.	+	MLE	Interval
<i>Anopheles algeriensis</i>	100																100			
<i>An. atroparvus</i>	517							1.035					3.294	1	0,30	0,02-1,46	4.846	1	0,21	0,01-1,00
<i>An. claviger</i>	1																1			
<i>An. maculipennis</i>													1				1			
<i>An. plumbeus</i>	9				2												11			
<i>Anopheles sp.</i>					2								86				88			
<i>Aedes albopictus</i>					15	1	47,14	4,24-220,20									15	1	47,14	4,24-220,20
<i>Ae. vexans</i>													427	16	43,67	28,64-66,58	427	16	43,67	28,64-66,58
<i>Ochlerotatus caspius</i>	22.910	6	0,26	0,11-0,54	260	2	7,22	1,45-22,54	4.092	8	1,98	0,93-3,74	2.556	12	4,75	2,66-7,89	29.818	28	0,94	0,64-1,34
<i>Oc. detritus</i>	1.714	1	0,58	0,03-2,79									66	1	13,54	0,91-62,43	1.780	2	1,12	0,20-3,62
<i>Oc. geniculatus</i>	2																2			
<i>Oc. pulcritarsis</i>					5												5			
<i>Culex modestus</i>	95				1				3.240								3.336			
<i>Cx. perexiguus</i>	47																47			
<i>Cx. pipiens</i>	8.425	5	0,59	0,22-1,3	6.347				393				8.396	4	0,48	0,16-1,15	23.561	9	0,38	0,19-0,70
<i>Cx. theileri</i>	6.672	48	8,45	6,47-10,95									1.266	2	1,56	0,29-5,06	7.938	50	7,20	5,50-9,30
<i>Culex sp.</i>	319																319			
<i>Culiseta annulata</i>	42	2	48,24	8,77-49,36									14				56	2	36,00	6,53-112,86
<i>Cs. longiareolata</i>	54	1	17,94	1,08-82,13	359				1								414	1	2,41	0,14-11,59
<i>Cs. subochrea</i>	1				4												5			
<i>Culiseta sp.</i>	1	1	1.000		2												3	1	333,33	20,74-833,33
<i>Coquillettidia richiardii</i>	113				2				6								121			
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	1																1			
Total	41.023	64	1,60	1,25-2,02	6.999	3	0,43	0,11-1,15	8.767	8	0,92	0,43-1,74	16.106	36	2,26	1,62-3,08	72.895	111	1,55	1,28-1,86

Taula 2. Nombre de mosquits per espècies, pools positius i MLE. Nre. és el nombre de mosquits capturats, + és el nombre de pools positius i interval és el de confiança per 95 %. El MLE de *Culiseta sp.* a Huelva no és calculable i el valor correspon al seu MIR.

Flebòtoms

En el cas dels flebòtoms (Taula 3, Fig. 7 i Annex), dels 6.871 insectes capturats, el 99,4 % i el 86,4 % dels pools es van obtenir a Barcelona. Dels 236 pools, 10 (9 de Barcelona i 1 de Huelva) van donar positiu a *Flavivirus* semblants a CxFV i és la primera vegada que es troba genoma d'aquest gènere en flebòtoms fora de l'Àfrica (Fontenille et al, 1994).

	Huelva				Barcelona				Total			
	Nre.	Pools	+F	+P	Nre.	Pools	+F	+P	Nre.	Pools	+F	+P
2002	-	-	-	-	1.388	55	1	2	1.388	55	1	2
2003	14	11	0	0	3.099	51	4	1	3.113	62	4	1
2004	10	9	0	0	1.646	51	2	2	1.656	60	2	2
2005	19	12	1	0	695	47	2	3	714	59	3	3
Total	43	32	1	0	6.828	204	9	8	6.871	236	10	8

Taula 3. Nombre de flebòtoms capturats i nombre de pools. +F són els pools positius a *Flavivirus* i +P, pools positius a *Phlebovirus*. No hi va haver captures a Huelva el 2002.

En 8 pools de Barcelona es va trobar un *Phlebovirus* diferent dels existents a les bases de dades amb l'excepció de l'anomenat Massilia, recentment seqüenciat per Charrel i col·laboradors (2009), i que es va trobar en flebòtoms a França. Pertany a un grup relacionat amb els virus del complex Nàpols (serotips TOSV i Nàpols) i semblen tenir una distribució àmplia, ja que s'haurien trobat a Catalunya, al sud de França i a Andalusia (Charrel et al, 2005). Aquesta és la primera vegada que, conjuntament amb d'altres de la xarxa EVITAR, s'analitzen mostres de flebòtoms en la recerca d'arbovirus. L'obtenció de pools positius a Barcelona cada any tant *Flavivirus* com *Phlebovirus* mostra una presència continuada d'aquest genoma a la zona. Així i tot, el fet que quasi tots els positius s'hagin obtingut a Barcelona pot ser degut al fet que la gran majoria de mostres es va recollir en aquesta zona.

Flavivirus i *Phlebovirus*

Pel que fa a la filogènia del conjunt de *Flavivirus* obtinguts, cal assenyalar que la majoria de *Flavivirus* obtinguts estan relacionats amb *Flavivirus* de mosquit (CFA, KRV i CxFV) (Fig. 7B-E). Dintre d'aquests, hi ha un grup, principalment de positius a *Ae. vexans*, però també a *Oc. caspius*, *Oc. detritus* i *Cx. pipiens*, més propers a CFA i KRV (Fig. 7B). El grup més abundant i heterogeni és format per un grup de positius al gènere *Culex* i proper a CxFV (Fig. 7E). Positius a *Oc. caspius* es troben en diversos grups, però n'hi ha un de format per un conjunt de positius en diverses àrees geogràfiques que s'agrupen en un conglomerat o clúster específic proper a CxFV (Fig. 7D).

Dins dels propers a *Flavivirus* de mosquits, el darrer grup és format per positius en algunes espècies de mosquits (*Oc. detritus* i *Cs. annulata*) i els positius en flebòtoms, tots molt propers (Fig. 7C).

Les seqüències de dos pools d'Andalusia d'*Oc. caspius* són les úniques que es troben properes al grup de virus transmèsos per artròpodes (Fig. 7E).

Tal com ja s'ha explicat, les seqüències de *Phlebovirus* trobades en pools positius a flebòtoms també són diferents de les existents en les bases de dades, excepte de la referent a un nou *Phlebovirus* anomenat Massilia virus trobat en flebòtoms obtinguts de captures a França, al qual poden pertànyer les mostres de Barcelona i que es troba relacionat amb el complex Nàpols (serotips TOSV i Nàpols) (Fig. 7F).

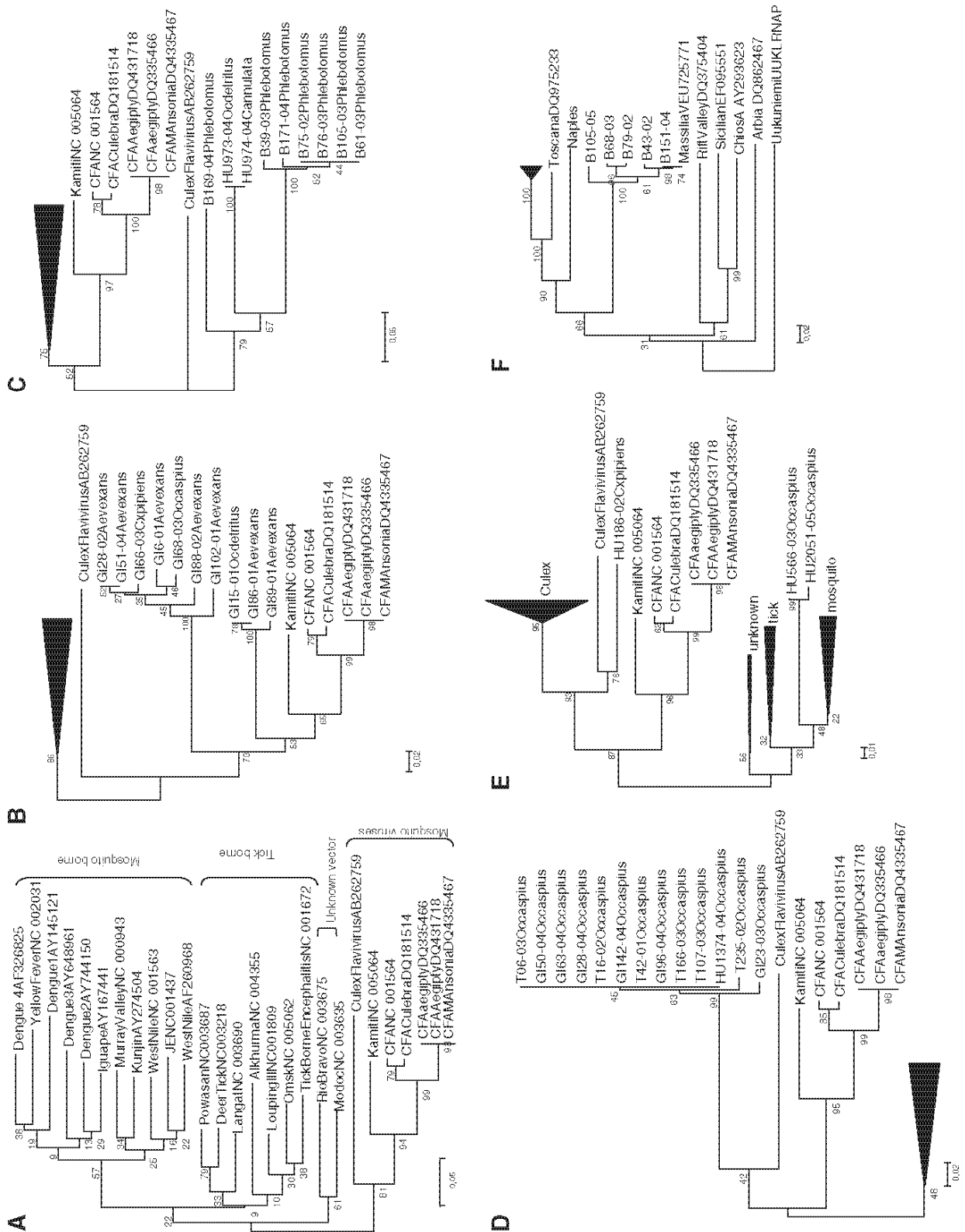


Figura 7. Per la llegenda, consulteu Figura 1 de l'article 4, pàgina 3.

Finalment, i tenint en compte la presència detectada recentment de seqüències de genoma relacionades amb CFA en el genoma de mosquits del gènere *Aedes* (CSA: *cell silent agent*) (Crochu et al, 2004), es va procedir a comprovar que els positius obtinguts eren realment el resultat d'una amplificació d'ARN. Els resultats aplicats en una mostra del total de positius indica que algunes mostres poden provenir de l'amplificació d'ADN. En el cas del grup *Culex*, de set mostres analitzades, una de *Cx. pipiens* va ser concordant amb ADN. En el cas del grup d'*Ochlerotatus*, tres de nou van ser també d'ADN i en el cas del grup d'*Aedes*, cinc de cinc van ser d'ADN. El grup dels dos positius per *Oc. caspius* propers a virus transmesos per artròpodes van correspondre tots a ARN. Pel que fa als flebotoms, cap dels cinc analitzats va ser d'ADN.

Aquests resultats sorprenents indiquen que, en part de les mostres, el genoma detectat era probablement seqüències d'ADN integrades en el genoma dels mosquits, especialment en el cas del gènere *Aedes* i en *Ochlerotatus*, un gènere inclòs anteriorment com a subgènere dins l'*Aedes*. Sembla, doncs, que seqüències de *Flavivirus* són presents en mosquits capturats a Espanya.

Amb tot aquest conjunt de dades, cal revisar les dades de presència de *Flavivirus*, en especial en les espècies del gènere *Aedes*. De la resta, les que han obtingut més resultats positius es troben en els gèneres *Ochlerotatus*, *Culex* i *Culiseta*, mentre que el gènere *Anopheles* és el que ha obtingut espècies amb menys positius. Totes les espècies amb positius dels gèneres *Ochlerotatus*, *Culex* i *Anopheles* són fortament agressives i picadores d'aus, humans i altres mamífers, llevat de *Cx. pipiens* que, segons àrees geogràfiques i hàbitats larvaris, manifesta un gradient d'ornitofília i mamofília variable. Un cas especial és també el de *Cs. annulata* i *Cs. longiareolata*, espècies quasi exclusivament ornitòfiles.

Detecció del virus Usutu (USUV)

El 2006, i seguint amb la campanya de detecció d'arbovirus, es va trobar, entre 436 pools dels quatre aiguamolls de Catalunya i 9 espècies de mosquit, un de positiu a un *Flavivirus* identificat com a virus Usutu (USUV) en un pool de 3 *Cx. pipiens* obtinguts a Viladecans (Barcelona) en una àrea on s'alimentaven i criaven aus sedentàries i migradores com *Passer domesticus*, *Hirundo rustica*, o *Delichon urbica*. La soca USUV detectada va mostrar una homologia de 97,97 % amb la soca SAAR-1776 de Sud-àfrica. Va mostrar una similitud de 94,94 % amb la soca USUV de Viena del 2001 i la USUV de Budapest (Fig. 8).

	1	60
USUV Austria	GAAGCGTGAGAAGAAGCTCGGAGAGTTTGGTAAAGCGAAAGGTAGTCGAGCCATATGGTT	
USUV Hungary	
USUV S. AfricaC.....C.....	
USUV SpainC.....C.....	
	61	99
USUV Austria	CATGTGGCTAGGCGCCAGATTCCCTGGAGTTTGAAGCTCT	
USUV Hungary	
USUV S. AfricaC..	
USUV Spain	T.....CT.	

Figura 8. Comparació de nucleòtids del fragment seqüenciat entre altres virus Usutu (USUV) relacionats. Els punts assenyalen nucleòtids coincidents.

Les dades d'homologia indiquen que la soca espanyola pertany a USUV, però que és més propera a mostres africanes d'USUV que a les obtingudes a l'Europa central. Fins ara, no s'ha observat mortalitat en aus associada a una encefalitis viral a Barcelona. Una possible explicació podria ser donada per la hipòtesi que l'USUV i altres arbovirus com el VNO poden estar circulant a Espanya

per la introducció d'aus migradores des de l'Àfrica. En aquestes circumstàncies, resistència natural genètica, immunitat de grup i immunitat creuada protectora causada per virus molt similars poden proporcionar algun tipus de protecció contra infeccions simptomàtiques. En tot cas, el descobriment de l'USUV més proper a soques de l'Àfrica que d'Europa reafirma les evidències que l'USUV i altres com el VNO s'introdueixen i re introduïxen a l'Europa occidental des de l'Àfrica, probablement mitjançant les aus migradores.

CONCLUSIONS

S'ha obtingut una representació molt bona de les espècies de les poblacions de culícids, que ha estat superior al 40 % per cada una de les àrees estudiades. Les espècies de culícids més capturades (*Oc. caspius*, *Cx. pipiens*, *Cx. theileri*, *An. atroparvus* i *Cx. modestus*) coincideixen amb les més abundants al país i les que causen més molèsties. La metodologia de captura, malgrat que és diversa, ha permès d'elaborar una representació de les poblacions de mosquits més comuns i de part de les més poc freqüents.

A cada regió s'ha obtingut una proporció d'espècies característiques dels hàbitats on es localitzaven les trampes. A Huelva i Girona s'han obtingut més mosquits que a la resta, especialment a la primera zona. La diversitat d'espècies de culícids és més gran a Girona, seguida per la de Tarragona, Huelva i Barcelona.

S'ha detectat regularment genoma de *Flavivirus* i *Phlebovirus* desconeguts en diverses espècies de culícids i en la subfamília dels flebòtoms i per primera vegada a Espanya.

Pel que fa als culícids, s'ha detectat genoma de *Flavivirus* a cada una de les àrees estudiades en nou espècies i en cinc gèneres, fet que ha reflectit que hi ha una extensa presència de seqüències de genoma per a aquest gènere.

Les espècies de culícids amb més proporció de positius i un MLE més elevat no han estat les més abundants (*Ae. albopictus*, *Cs. annulata* i *Ae. vexans*), tot i que entre les espècies amb positius es troben les més abundants, excepte en el cas de *Cx. modestus*, única espècie abundant sense positius.

Els valors més elevats de pools positius a *Flavivirus* s'han obtingut on es van capturar més mosquits, però no on es van recollir mostres de més localitats. El nombre de pools positius guarda una correlació positiva amb el nombre de mosquits capturats a tota la zona d'estudi.

La majoria del genoma detectat de *Flavivirus* s'agrupa al voltant de virus propis de mosquits excepte en el cas de dos positius a *Oc. caspius*, que estan propers al grup de virus transmesos per artròpodes.

El genoma de *Flavivirus* s'ha detectat en flebòtoms, especialment a Barcelona, i és la primera vegada que es descriu fora de l'Àfrica.

Algunes de les mostres positives a genoma de *Flavivirus* en culícids poden correspondre a genoma de *Flavivirus* integrat al genoma del mosquit. És la primera vegada que es descriu aquest fenomen en el gènere *Culex*.

S'ha detectat genoma de *Phlebovirus* similar a Massilia a Barcelona i és la primera vegada que s'ha trobat en flebòtoms a Espanya.

També s'ha detectat per primer cop l'espècie de culícid invasora *Ae. albopictus* a Espanya i la península Ibèrica i és la primera vegada que es detecta en aquesta espècie un positiu a genoma de *Flavivirus*.

S'ha trobat, per primera vegada a Espanya i a la península Ibèrica un pool positiu a un *Flavivirus* identificat com a USUV en un pool de *Cx. pipiens* obtinguts a Viladecans (Barcelona) molt proper a la soca USUV SAAR-1776 de Sud-àfrica.

ANNEX: RESULTATS OBTINGUTS EN FLEBÒTOMS ENTRE 2002 I 2005 A TOTES LES ÀREES

Cal assenyalar que les dades presentades en el quart article i que fan referència a flebòtoms analitzats no tenen en compte les dades de Catalunya del 2005, ja que les va analitzar el CReSA i no l'Institut Carlos III a Madrid. En aquest annex es presenten les dades completes entre 2002 i 2005 a les àrees on es van obtenir flebòtoms: Barcelona i Huelva (Taula 4). La metodologia emprada per obtenir les mostres ha estat la mateixa que pels culícids. De fet, el flebòtoms i els mosquits es capturaven conjuntament i se separaven posteriorment. Cal destacar que per la impossibilitat de classificar els flebòtoms segons la morfologia externa i per no haver de fer disseccions que podien malmetre la mostra, tots aquests dípters es van agrupar per subfamília i no per espècie.

A Barcelona, al Baix Llobregat, les captures es van dur a terme quinzenalment utilitzant trampes EVS amb CO₂ i a Andalusia les captures es van fer cada setmana amb trampes CDC. Les trampes es van instal·lar a la tarda i es van recollir al dia següent, després de la sortida de sol.

Dels 6.871 flebòtoms capturats, el 99,4 % i el 86,4 % dels pools es van obtenir a Barcelona. Dels 236 pools, 10 (9 de Barcelona i 1 de Huelva) van donar positiu a *Flavivirus* semblants a CxFV, i ha estat la primera vegada que s'ha trobat un genoma d'aquest gènere en flebòtoms fora de l'Àfrica (Fontenille et al, 1994).

	Huelva				Barcelona				Total			
	Nre.	Pools	+F	+P	Nre.	Pools	+F	+P	Nre.	Pools	+F	+P
2002	-	-	-	-	1.388	55	1	2	1.388	55	1	2
2003	14	11	0	0	3.099	51	4	1	3.113	62	4	1
2004	10	9	0	0	1.646	51	2	2	1.656	60	2	2
2005	19	12	1	0	695	47	2	3	714	59	3	3
Total	43	32	1	0	6.828	204	9	8	6.871	236	10	8

Taula 4. Nombre de flebòtoms capturats i nombre de pools. +F són els pools positius a *Flavivirus* i +P, pools positius a *Phlebovirus*. No hi va haver captures a Huelva el 2002.

En 8 pools de Barcelona es va trobar un *Phlebovirus* diferent dels existents en les bases de dades amb l'excepció de l'anomenat Massilia, recentment seqüenciat per Charrel i col·laboradors (2009) i trobat en flebòtoms a França. Pertany a un grup relacionat amb els virus del complex Nàpols (serotips TOSV i Nàpols) i sembla tenir una distribució àmplia ja que s'han trobat a Catalunya, al sud de França i també a Andalusia (Charrel et al, 2005). Aquesta és la primera vegada que, conjuntament amb d'altres de la xarxa EVITAR, s'analitzen mostres de flebòtoms en la recerca d'arbovirus. L'obtenció de pools positius tant a *Flavivirus* com a *Phlebovirus* a Barcelona cada any, mostra una presència continuada d'aquest genoma a la zona. El fet que gairebé tots els positius s'hagin obtingut a Barcelona pot ser degut a que la majoria de mostres es va recollir en aquesta zona.

Finalment, i tenint en compte la presència detectada recentment de seqüències de genoma relacionades amb CFA en el genoma de mosquits del gènere *Aedes* (CSA: *cell silent agent*) (Crochu et al, 2004), es va procedir a comprovar que els positius obtinguts eren realment el resultat d'una amplificació d'ARN. Pel que fa als flebòtoms cap dels cinc analitzats va ser d'ADN.

BIBLIOGRAFIA

Alcaide, M, Rico, C, Ruiz, S, Muñoz, J, Soriguer, R, Figuerola, J. 2009. A universal DNA barcoding method for the study of arthropod vector-borne pathogens. PLoS ONE 4(9): e7092.

Alvar, J. Las Leishmaniasis: de la biología al control. 2001. Laboratorios Intervet, Salamanca: 236 pgs.

Anderson, JF, Andreadis, TG, Vossbrinck, CR, Tirrell, S, Wakem, EM, French RA, Garmendia, AE, Van Kruiningen, HJ, 1999. Isolation of West Nile virus from mosquitoes, crows, and a Cooper's hawk in Connecticut. Science 286: 2331-2333.

Angelini, R, Finarely, AC, Angelini, P, Po, C, Petropulacos, K, Silvi, G, Macini, P, Fortuna, C, Venturi, G, Magurano, F, Fiorentini, C, Marchi, A, Benedetti, E, Bucci, P, Boros, S, Romi, R, Majori, G, Ciufolini, MG, Nicoletti, J, Rezza, G, Cassone, A. 2007. Chikungunya in North-Eastern Italy: a summing up of the outbreak. Euro. Surveill 2007. 12: E071122.2.
<http://www.eurosurveillance.org/ew/2007/071122.asp#2>.

Anònim. 1989. Control de les poblacions de mosquits al Baix Llobregat. Barcelona. Consell Comarcal del Baix Llobregat i MMAMB.

Aranda, C, Eritja, R. 1998. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of the Baix Llobregat, Barcelona, Spain. Act. Parasitol. Portug. 5: 28. 192 pgs.

Aranda, C, Eritja, R, Schaffner, F, Escosa, R. 2000. *Culex (Culex) torrentium* Martini (Diptera: Culicidae) a new species from Spain. Europ. Mosq. Bull. 8: 7-9.

Aranda, C, Eritja, R, Roiz, D. 2006. First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. Med. Vet. Entomol. 20: 150-152.

Aransay, A, Testa, J, Morillas-Marquez, F, Lucientes, J, Ready, P. 2004. Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. Parasitol. Res. 94 6. 416-420.

Arias Encobet, J. 1912. Datos para el conocimiento de la distribución de los Dípteros de España. Real Soc. Esp. Hist. Nat. 7: 61-246.

Bernabeu-Wittel, M, Ruiz-Pérez, M, Del Toro, M, Aznar, J, Muniain, MA, de Ory, F, Domingo, C, Pachón, J. 2007. West Nile virus past infections in the general population of Southern Spain. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 25: 561-565.

Biggerstaff, B. 2004. PoolInfRate, version 2.0. An Excel Add.In to compute infection rates from pooled data. CDC.
<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/software.htm>.

Bofill, D, Domingo, C, Cardenosa, N, Zaragoza, J, de Ory, F, Minguell, S, Sanchez-Seco, MP, Dominguez, A, Tenorio, A. 2006. Human West Nile virus infection, Catalonia, Spain. Emerg. Infect. Dis. 12: 1163-1164.

Botet, J. 1991. Los Phlebotominae (Insecta, Diptera) de Barcelona en tanto que vectores de Leishmania Ross, 1903. Contribución a su conocimiento. Tesi doctoral. Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona. 310 pgs.

Bibliografía

Cáceres, F. 2002. Bases Técnicas para el Control de Mosquitos de la Costa de Huelva. Sevilla. Universidad de Sevilla. Tesis Doctoral.

Cammissa-Parks, H, Cisar, LA, Kane, A, Stollar, V. 1992. The complete nucleotide sequence of cell fusing agent (CFA): homology between the nonstructural proteins encoded by CFA and the nonstructural proteins encoded by arthropod-borne flaviviruses. *Virology*. 189: 511-24.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2010a.
<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/birdspecies.htm>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2010b.
<http://www.cdc.gov/malaria/>

Charrel, RN, Gallian, P, Navarro-Mari, JM, Nicoletti, L, Papa, A, Sánchez-Seco, MP, Tenorio, A, de Lamballerie, X. 2005. Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 1657-1663.

Charrel, RN, Moureau, G, Temmam, S, Izri, A, Marty, P, Parola, P, Travassos da Rosa, A, Tesh, RB, de Lamballerie, X. 2009. Massilia virus, a novel phlebovirus (*Bunyaviridae*) isolated from sandflies in the Mediterranean. *Vector Borne Zoonot. Dis.* 9: 519-530.

Clavero, G. 1946. Aedinos de España. *Rev. San. Hig. Pub.* 20: 1205-1232.

Clavero, G. 1961. La erradicación del paludismo en España. *Rev. San. Hig. Pub.* 5-6: 265-292.

Clements, AN. 1992. The biology of mosquitoes. Volume 1: Development, nutrition and reproduction. London. Ed. Chapman & Hall. 509 pgs.

Clements, AN. 1999. The biology of mosquitoes, volume 2: Sensory reception and behaviour. Wallingford. Ed. CABI Publishing. 740 pgs.

Cook, S, Bennett, SN, Holmes, EC, De Chesse, R, Moureau, G, De Lamballerie, X. 2006. Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *J. Gen. Virol.* 87: 735-48.

Crabtree, MB, Sang, RC, Stollar, V, Dunster, LM, Miller, BR. 2003. Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus. Kamiti River virus. *Arch. Virol.* 148: 1095-1118.

Crochu, S, Cook, S, Attoui, H, Charrel, RN, de Chesse, R, Belhouchet, M, Lemasson, JJ, de Micco, P, de Lamballerie, X. 2004. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *J. Gen. Virol.* 85: 1971-1980.

Deubel, V, Gubler, D, Layton, M, Malkinson, M. 2001. West Nile Virus: A Newly Emergent Epidemic Disease. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 536.

Domingo, C, Collao, X, Falcón, A, Ledesma, J, Negredo, A, Pozo, F, Roiz, D, Vázquez, A, Vázquez, S. 2007. Virus importados en nuestro ámbito sanitario: situación actual y riesgos de futuro. *Virología.* 12: 7-35.

Del Giudice, P, Schuffenecker, I, Vandenbos, F, Counillon, E, Zeller, H. 2004. Human West Nile virus, France. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 1885-1886.

Eldridge, BF, Edman, JD. 2000. Medical entomology : a textbook on public health and veterinary problems caused by arthropods . Dordrecht, Boston, London. Kluwer Academic. 659pgs.

Encinas Grandes, A. 1982. Taxonomía y biología de los mosquitos del área salmantina (Diptera, Culicidae) CSIC - Ed. Universidad de Salamanca. 437pgs.

Eritja, R, Aranda, C, Padròs, J, Goula, M, Lucientes, J, Escosa, R., Marquès, E. and Cáceres, F. 2000. An annotated checklist and bibliography of the mosquitoes of Spain (Diptera: Culicidae). Europ. Mosq. Bull. 8: 10-18.

Esteves, AA, Almeida, PG, Galao, RP, Piedade, L, Rodrigues, JZ, Sousa CA. 2005. West Nile Virus in Southern Portugal, 2004. Vector Borne Zoonotic Dis. 5:410-413.

Fauna Ibérica. 2010.

<http://iberfauna.mncn.csic.es/index.aspx>

Figuerola, J, Soriguer, R, Rojo, G, Gómez Tejedor, C, Jimenez-Clavero, MA. 2007a. Seroconversion in wild birds and local circulation of West Nile virus, Spain. Emer. Infect. Dis. 13: 1915-1917.

Figuerola, J, Jiménez-Clavero, MA, Rojo, G, Gómez-Tejedor, C, Soriguer, R. 2007b. Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in colonial aquatic birds in southern Spain. Avian Pathol. 36: 209-212.

Figuerola, J, Jiménez-Clavero, MA, López, G, Rubio, C, Soriguer, R, Gómez-Tejedor, C, Tenorio, A. 2008. Size matters: West Nile Virus neutralizing antibodies in resident and migratory birds in Spain. Vet Microbiol. 132: 39-46.

Figuerola, J, Baouab, RE, Soriguer, R, Fassi-Fihri, O, Llorente, F, Jiménez-Clavero, MA. 2009. West Nile virus antibodies in wild birds, Morocco, 2008. Emerg Infect Dis. 15: 1651-1653.

Fontenille, D, Traore-Lamizana, M, Trouillet, J, Leclerc, A, Mondo, M, Ba, Y, Digoutte, JP, Zeller, H.G. 1994. First isolations of arboviruses from phlebotomine sand flies in West Africa. Am. J. Trop. Med. Hyg. 5: 570-574.

Gállego, J, Botet, J, Gállego, M, Portus, M. 1992. Los flebotomos de la España Peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura. "In memoriam" al profesor Doctor D. E. de P. Martínez Gómez: 58 1-597.

Gil Collado, J. 1954. Orientaciones actuales sobre la sistemática del complejo *maculipennis* del género *Anopheles*. Med. Col. 24: 219-230.

Grard, G, Lemasson, JJ, Sylla, M, Dubot, A, Cook, S, Molez, JF, Pourrut, X, Charrel, R, Gonzalez, JP, Munderloh, U, Holmes, EC, de Lamballerie, X. 2006. Ngoye virus: a novel evolutionary lineage within the genus Flavivirus. J. Gen. Virol. 87: 3273-3277.

Gubler, D J. 2002. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. Arch. Med. Res. 33: 330-342.

Higgs, S. 2005. Journal Policy on Names of Aedine Mosquito Genera and Subgenera. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 5: 93-94.

Bibliografía

Hoshino, K, Isawa, H, Tsuda, Y, Yano, K, Sasaki, T, Yuda, M, Takasaki, T, Kobayashi, M, Sawabe, K. 2007. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology*. 359: 405-414.

Hubálek, Z, Halouzka, J. 1999. West Nile Fever a Reemerging Mosquito Borne Viral Disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 643-650.

Hubálek, Z, Kriz, B, Menne, B, Bertollini, R. 2003. West Nile Virus: Ecology, epidemiology, and prevention. cCASHs tech. Document N° 3. 1st draft for comments. Unedited. WHO. Eur/01/5036811. 32 pgs.

Jiménez-Clavero, M A, Gómez Tejedor, C, Rojo, G, Soriguer, R, Figuerola, J. Serosurvey of West Nile virus in equids and bovids in Spain. 2007. *Vet. Rec.* 161: 212.

Jiménez-Clavero, MA, Sotelo, E, Fernandez-Pinero, J, Llorente, F, Blanco, JM, Rodriguez-Ramos, J, et al. West Nile virus in golden eagles, Spain, 2007. 2008. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1489-1491.

JME Editors 2005. Journal Policy on Names of Aedine Mosquito Genera and Subgenera. *Journal of Medical Entomology* 42: 511.

Kaptoul, D, Viladrich, PF, Domingo, C, Niubó, J, Martínez-Yélamos, S, de Ory, F, Tenorio, A. 2007. West Nile virus in Spain: Report of the first diagnosed case (in Spain) in a human with aseptic meningitis, *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 39: 70-71.

Karabatsos N. International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates. 1985. 2001 update. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* San Antonio, TX, USA.

Kilpatrick, AM. 2005. West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm. *Emerg Infect Dis.* 11: 425-429.

Knight, KL, Stone, A. 1977. A catalog of the mosquitoes of the World. (Diptera: Culicidae). 2nd ed. The Thomas Say Foundation 6. 611 pgs.

Kulasekera, A, Kramer, L, Nasci, R, Mostashari, F, Cherry, B, Trock, S, Glaser, C, Miller, J. 2001. West Nile Infection in Mosquitoes, Birds, Horses, and Humans, Staten Island, New York, 2000. *Emerging Infectious Diseases*. 7: 722-725.

López, G, Jiménez-Clavero, MA, Tejedor, CJ, Soriguer, R, Figuerola, J. 2008. Prevalence of West Nile Virus Neutralizing Antibodies in Spain is Related to the Behavior of Migratory Birds. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8: 615-621.

López Sánchez, S. 1989. Control integral de mosquitos en Huelva. Junta de Andalucía. Sevilla. 340 pgs.

Lozano, A, Filipe, AR. 1998. Anticuerpos frente a virus West Nile y otros virus transmitidos por artrópodos en la población del Delta del Ebro. *Rev. Esp. Salud Pública.* May-Jun: 245-250.

Lucientes Curdi, J. 1986. Contribución al conocimiento epidemiológico de la leishmaniosis visceral canina en Zaragoza: Estudio biológico y ecológico de las poblaciones de los flebotomos vectores. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Zaragoza. 449 pgs.

Lundström, J. 1999. Mosquito Borne Viruses in Western Europe: A Review. *J. Vect. Ecol.* 24: 1-39.

- Mezquida Lopez, G. 1990. Estudio poblacional de los *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) del Bajo Llobregat. Tesina, Facultad de Farmàcia. Universitat de Barcelona. 294 pgs
- Miller, B, Nasci, R, Godsey, S, Savage, H, Lutwama, J, Lanciotti, R, Peters, C. 2000. First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex from Rift Valley Province, Kenya. Am. J. Trop. Med. Hyg. 62: 240-246.
- Molaei, G, Andreadis, TG, Armstrong, PM, Bueno, R Jr, Dennett, JA, Real, SV, Sargent, C, Adilekhdid, B, Randle, Y, Guzman, H, Travassos de Rosa, A, Wuithiranyagool, T, Tesh, RB, 2007. Host feeding pattern of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and its role in transmission of West Nile virus in Harris County, Texas. Am. J. Trop. Med. Hyg. 77: 73-81.
- Murgue, B, Murri, S, Zientara, S, Durand, B, Durand, JP, Zeller, H. 2001. West Nile Outbreak in Horses in Southern France, 2000: The Return after 35 Years. Emerg. Infect. Dis. 7: 692-696.
- Nasci, R, Savage, H, White, D, Miller, J, Cropp, B, Godsey, M, Kerst, A, Bennett, P, Gottfried, K, Lanciotti, R. 2001. West Nile Virus in Overwintering *Culex* mosquitoes, New York City, 2000. Emerg. Infect. Dis. 7: 742-744.
- Padrós, J. 1997. Culícids del Baix Llobregat (Diptera: Culicidae) Faunística i Biologia. Barcelona. Universitat de Barcelona.
- Pletsch, D. 1965. Informe sobre una misión efectuada en España en Septiembre-Noviembre de 1963 destinada a la certificación de la erradicación del paludismo. Rev. San. Hig. Pub.. 7,8,9: 309-355.
- Reinert JF, 2000. New classification for the composite genus *Aedes* (Diptera: Culicidae: Aedini), elevation of subgenus Ochlerotatus to generic rank, reclassification of the other subgenera, and notes on certain subgenera and species. J. Am. Mosq. Contr. Assoc. 16: 175-188.
- Reinert, JF, Harbach, RE, Kitching, IJ. 2004. Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. Zool. J. Linn. Soc. 142: 289-368.
- Rico-Avelló y Rico.1950. La epidemia de paludismo de la posguerra. Rev. San. Hig. Pub. 24: 701-737.
- Roehrig, JT, Layton, M, Smith, P, Campbell, GL, Nasci, R, Lanciotti, RS. 2002. The emergence of West Nile virus in North America: ecology, epidemiology, and surveillance. Curr. Top Microbiol. Immunol. 267: 223-240.
- Roiz, D, Vázquez, A, Seco, MP, Tenorio, A, Rizzoli, A. 2009. Detection of novel insect flavivirus sequences integrated in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Northern Italy. Virol. J. 6: 93-99.
- Romeo Viamonte, JM. 1950. Los anofelinos de España y de la zona española del Protectorado de Marruecos. Su relación con la difusión del paludismo. Tesis Doctoral. Rev. San. Hig. Pub. 24: 213-295.
- Sanbonmatsu-Gámez, S, Pérez-Ruiz, M, Collao, X, Sánchez-Seco, MP, Morillas-Márquez, F, de la Rosa-Fraile, M, Navarro-Mari, JM, Tenorio, A. 2005. Toscana virus in Spain. Emerg. Infect. Dis. 11: 1701-1707.

Bibliografía

Sánchez-Seco, MP, Navarro, JM. 2005. Infecciones por el virus Toscana, el virus del Nilo Occidental y otros arbovirus de interés en Europa. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23: 560-568.

Sánchez-Seco, MP, Rosario, D, Domingo, C, Hernandez, L, Valdes, K, Guzmán, MG, Tenorio, A. 2005. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J. Virol. Methods.* 126: 101-109.

Sang, RC, Gichogo, A, Gachoya, J, Dunster, MD, Ofula, V, Hunt, AR, Crabtree, MB, Miller, BR, Dunster, LM. 2003. Isolation of a new flavivirus related to cell fusing agent virus (CFAV) from field-collected flood-water *Aedes* mosquitoes sampled from a dambo in central Kenya. *Arch. Virol.* 148:1085-1093.

Savage, H, Ceianu, C, Nicolescu, G, Karabatsos, N, Lanciotti, R, Vladimirescu, A, Laiv, L, Ungureanu, A, Romanca, C, Tsai, T. 1999. Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *Am. Journal Trop. Med. and Hyg.* 61: 600-611.

Savini, G, Monaco, F, Calistri, P, Lelli, R, 2008. Phylogenetic analysis of West Nile virus isolated in Italy in 2008. 2008. *Euro Surveill.* 13 (48) pii: 19048.

Saxena, SK, Singh, M, Mishra, N, Lakshmi, V. Resurgence of Chikungunya virus in India: an emerging threat. 2006. *Euro Surveill.* Aug 10; 11:E060810.2.
<http://www.eurosurveillance.org/ew/2006/060810.asp#2>.

Schaffner, E, Angel, G, Geoffroy, B, Hervy, JP, Rhaeim, A. 2001. *The Mosquitoes of Europe*. [CD-ROM] Paris. IRD editions.

Schuffenecker, I, Peyrefitte, CN, el Harrak, M, Murri, S, Leblond, A, Zeller, H. 2005. West Nile virus in Morocco, 2003. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 306-309.

Shoemaker, T, Boulianne, C, Vincent, MJ, Pezzanite L, Al-Qahtani, MM, Al-mazrou, Y, Khan, AS, Rollin, PE, Swanepoel, R; Ksiazek, TG, Nichol, ST. 2002. Genetic analysis of viruses associated with emergence of Rift Valley fever in Saudi Arabia and Yemen, 2000-01. *Emerg. Infect. Dis.* 8:1415-1420.

Simpson, H. Measurement of Diversity. 1949. *Nature.* 163: 688.

Service, MW. 1993. *Mosquito Ecology. Field sampling methods.* 2nd ed. Chapman and Hall, London. 988 pgs.

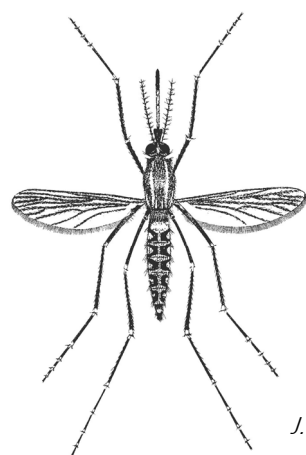
Sotelo, E, Fernandez-Pinero, J Llorente, F, Agüero, M, Hoefle, U, Blanco, JM, Jiménez-Clavero, MA. Characterization of West Nile virus isolates from Spain: new insights into the distinct West Nile virus eco-epidemiology in the Western Mediterranean. 2009. *Virology* 395: 289-297.

Staikowsky, F, Pinar, A, Cand, E, Grivard, P, Tallermin, F, Michauld, A. 2006. The infection by the virus Chikungunya: an emergent disease in the Reunion island. *Eur. J. Emerg. Med.* 13: 7-8.

Stollar, V, Thomas, VL. 1975. An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology* 64: 367-377.

Takken, W, Knols, BG. 2007. *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe: ecology and control of vector-borne diseases.* Wageningen University. Wageningen. 499 pgs.

- Torres Cañamares, F. 1951. Una nueva especie de *Aedes* (Dip. Cul.). EOS 27: 81-92.
- Trock, S, Meade, B, Glaser, A, Ostlund, E., Lanciotti, R, Cropp, B, Kulasekera, V, Kramer, L, Komar, N. 2001. West Nile virus outbreak among horses in New York State, 1999 and 2000. Emerg. Infect. Dis. 7: 745-747.
- Vázquez, A. 2008. Búsqueda de flavivirus en mosquitos de humedales españoles. Análisis molecular del virus West Nile y otros flavivirus. Tesis doctoral. UCM. Madrid. 130 pgs.
- Vázquez, A, Sánchez-Seco, MP, Ruiz, S, Molero, F, Hernández, L, Moreno, J, Magallanes, A, Gómez-Tejedor, C, Tenorio, A. 2010. Putative new lineage of West Nile virus, Spain. Emerg. Infect. Dis. 16: 549-552.
- Vallés, X, Sánchez, F. 2000. West Nile virus: el virus de la fiebre del Oeste del Nilo. Enf. Emerg. 2: 232-238.
- Weissenböck, H, Kolodziejek, J, Url, A, Lussy, H, Rebel-Bauder, B, Nowotny, N. 2002. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. Emerg. Infect. Dis. 8: 652-656.
- Zeller, HG, Schuffenecker, I. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. 2004. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 23: 147-56.



J. Salgado