



# **MEMORIA DE TESIS DOCTORAL**

## **Distribución, abundancia y composición de la comunidad de dípteros hematófagos vectores de enfermedades en Castilla-La Mancha: riesgos para la salud pública y la sanidad animal**

Mauricio Durán Martínez

Bajo la dirección de los doctores:

Christian Gortázar Schmidt

José Francisco Ruiz Fons

IREC (CSIC-UCLM-JCCM)  
Universidad de Castilla-La Mancha



**Distribución, abundancia y composición de la  
comunidad de dípteros hematófagos vectores de  
enfermedades en  
Castilla-La Mancha: riesgos para la salud  
pública y la sanidad animal**

MEMORIA PRESENTADA POR

**MAURICIO DURÁN MARTÍNEZ**

Para optar al grado de Doctor

VºBº Los Directores

Dr. Christian Gortázar Schmidt

Dr. José Francisco Ruiz Fons

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN RECURSOS CINEGÉTICOS  
CSIC-UCLM-JCCM

UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROFORESTAL Y  
GÉNÉTICA



La realización de este trabajo de Tesis Doctoral ha sido posible gracias a:

*Junta de Comunidades de Castilla – La Mancha.*

*Unión Europea – Fondo Europeo de Desarrollo Regional FEDER.*

*Fundación General - Universidad de Castilla – La Mancha.*

Este trabajo de Tesis Doctoral se realizó gracias a los siguientes proyectos y convenios:

*Proyecto POII09-0141-8176, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.*

*Convenio de colaboración*

*“Programa de diagnóstico de daños presuntamente causados por ataques de aves necrófagas” Junta de Comunidades de Castilla – La Mancha*



*A la Tierra, a la vida, ¡viva la Tierra y viva la vida!*





## Índice

<b>Estructura de la tesis</b> .....	I
<b>Introducción</b> .....	1
Enfermedades transmitidas por vectores: relevancia.....	3
Enfermedades transmitidas por vectores: factores condicionantes.....	4
Vectores del orden Diptera relevantes en salud pública y sanidad animal .....	10
Culícidos.....	11
Clasificación taxonómica, biología y ecología de los culícidos .....	11
Patógenos transmitidos por culícidos.....	17
<i>Culicoides</i> .....	19
Clasificación taxonómica, biología y ecología de los <i>Culicoides</i> .....	20
Patógenos transmitidos por <i>Culicoides</i> .....	24
Flebótomos.....	29
Clasificación taxonómica, biología y ecología de los flebótomos .....	29
Patógenos transmitidos por flebótomos .....	31
Vigilancia de dípteros vectores de enfermedades.....	33
Riesgos sanitarios asociados a las enfermedades transmitidas por vectores en Europa y España.....	36
Importancia del conocimiento de vectores a nivel regional: Castilla-La Mancha... ..	39
Bibliografía.....	42
<b>Objetivos</b> .....	53
Objetivo general.....	55
Objetivos específicos.....	55
<b>Capítulo 1:</b> Ecología espacial - composición, distribución y abundancia - de la comunidad de culícidos (Diptera: <i>Culicidae</i> ) en ambientes mediterráneos continentales: implicaciones en salud pública y sanidad animal .....	57
Resumen.....	59
Abstract.....	60
Introduction.....	61
Material and methods.....	64
Results.....	70
Discussion.....	75
Conclusions.....	82
Acknowledgements.....	82
References.....	83
<b>Capítulo 2:</b> Factores ecogeográficos determinantes de la abundancia de <i>Culex pipiens</i> (Diptera: <i>Culicidae</i> ) en zonas continentales mediterráneas de la península ibérica .....	87
Resumen.....	89
Abstract.....	90
Introduction.....	91
Material and methods.....	93
Results.....	102
Discussion.....	104

Acknowledgements .....	106
References.....	107
<b>Capítulo 3:</b> <i>Jejenes (Diptera: Ceratopogonidae)</i> en zonas no ganaderas del interior de la península ibérica: en busca de vectores potenciales del virus de la lengua azul.....	111
Resumen.....	113
Abstract.....	114
Introduction.....	115
Material and methods.....	118
Results.....	126
Discussion.....	130
Acknowledgements .....	134
References .....	135
<b>Capítulo 4:</b> Flebótomos vectores de <i>Leishmania infantum</i> en zonas continentales mediterráneas del interior de la península ibérica: riesgos para la salud pública y la sanidad animal.....	139
Resumen.....	141
Abstract.....	142
Introduction.....	143
Material and methods.....	145
Results.....	154
Discussion.....	156
Acknowledgements .....	161
References .....	162
<b>Discusión general</b> .....	167
Consideraciones metodológicas.....	169
Abundancia, diversidad y distribución de dípteros en Castilla – La Mancha y riesgos sanitarios asociados.....	171
Culícidos .....	171
Culicoides .....	174
Flebótomos .....	177
Riesgos futuros de enfermedades transmitidas por vectores en Europa y España..	179
Bibliografía .....	180
<b>Síntesis y Conclusiones</b> .....	185
Síntesis.....	187
Conclusiones.....	193
<b>Agradecimientos</b> .....	195

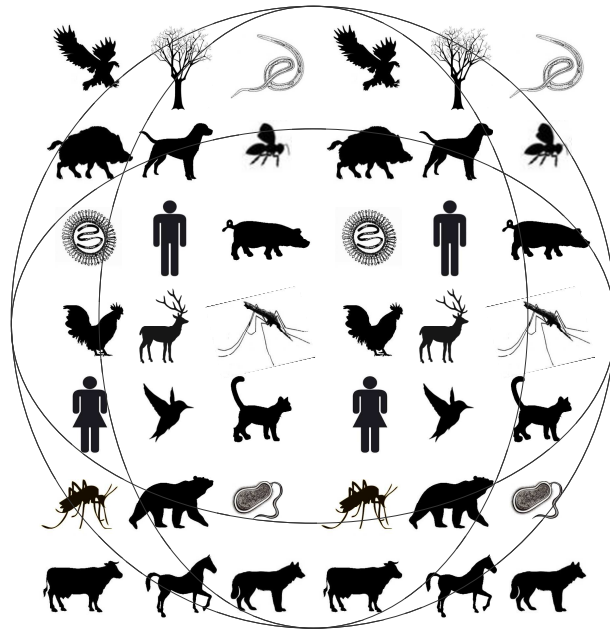
## Estructura de la Tesis

Esta Tesis Doctoral se organiza siguiendo el orden habitual de un trabajo científico. Comienza con un apartado de **Introducción** en el que se realiza una revisión general sobre los vectores del orden Díptera: culícidos, culicoides y flebótomos, describiendo su clasificación taxonómica, biología y ecología, así como su papel como vectores de patógenos. A continuación se presentan los **Objetivos** de trabajo planteados y los cuatro **Capítulos** que conforman el cuerpo de la Tesis Doctoral. Dichos capítulos están redactados en inglés y corresponden a artículos científicos en diferente estado de publicación. Cada uno de los capítulos se presenta según la estructura típica de un artículo: resumen, introducción, material y métodos, resultados, discusión y finalmente las referencias bibliográficas empleadas. A continuación se presenta una **Discusión General** en la que se engloban los diferentes estudios realizados y sus implicaciones en salud pública y animal. Finalmente, se recogen ordenadamente la **Síntesis** y **Conclusiones** obtenidas en los diferentes estudios que componen este trabajo de Tesis Doctoral.



# Introducción

---





## **Introducción**

### *Enfermedades transmitidas por vectores: relevancia*

En la actualidad, las enfermedades transmitidas por vectores (ETVs) se encuentran entre las enfermedades más relevantes en salud pública y sanidad animal. Las ETVs se caracterizan, en su mayoría, por su elevada capacidad de difusión y por su amplia distribución espacial y temporal (Becker et al. 2010), en parte debido a la gran diversidad de vectores y hospedadores implicados en la epidemiología de los agentes patógenos causales. Dentro de las ETVs encontramos numerosas enfermedades endémicas que son conocidas desde tiempos ancestrales, como es la malaria, pero también se encuentran enfermedades emergentes y re-emergentes, llamadas así debido a que su incidencia en territorios fuera de su distribución conocida se ha incrementado en el tiempo o amenaza con incrementarse en un futuro próximo, o debido a su resurgimiento en lugares de donde habían desaparecido o donde su incidencia había disminuido. La aparición o reaparición de estas enfermedades conlleva un enorme riesgo debido a su potencial para provocar epizootias (Daszak et al. 2000).

La gran relevancia que tienen las ETVs en salud pública radica en los graves cuadros clínicos y elevada mortalidad que causan en poblaciones humanas (Lederberg et al. 1992). Enfermedades como el dengue (Gubler 1998) y la malaria (Becker et al. 2010) son dos claros ejemplos de las dramáticas consecuencias de las ETVs en la salud pública. Según datos aportados por la organización Mundial de la Salud (OMS), se considera que las ETVs son responsables de aproximadamente el 24% de los casos de mortalidad descritos en humanos a escala mundial. Así mismo, en medicina veterinaria, las implicaciones que tienen las ETVs son alarmantes. La lengua azul (LA) por ejemplo, una enfermedad transmitida por jehenes del género *Culicoides*, ha causado grandes pérdidas económicas debido principalmente a las restricciones del movimiento de

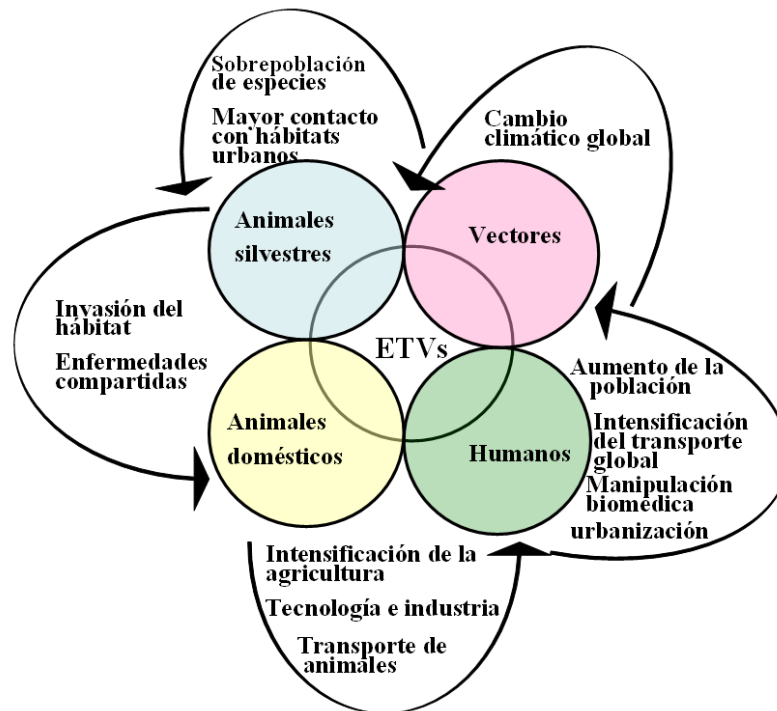
animales y sus productos con fines comerciales, así como debido a las propias medidas de control como la vacunación de los rumiantes domésticos en Europa (Bram et al. 2002; Maclachlan 2010). Un ejemplo muy reciente es el de la aparición por primera vez a nivel mundial del virus de Schmallenberg (Hoffmann et al. 2012) – cuya transmisión ha sido vinculada a jehenes del género *Culicoides* – y que ha generado un gran revuelo en la Unión Europea y problemas en el comercio de animales y subproductos con terceros países. En menos de un año el virus y la enfermedad que ocasiona se ha expandido por gran parte de Europa, mostrando el potencial de emergencia de las enfermedades vectoriales (Lievaart-Peterson et al. 2012). Resultan también destacables los daños ecológicos que las ETVs pueden ocasionar al afectar directa e indirectamente a las poblaciones de animales silvestres. Cuando el daño se infringe a especies amenazadas, los efectos sobre la conservación son aún más evidentes y relevantes. Tal es el caso del virus West Nile (WN), que afecta un gran número de animales, tanto aves como mamíferos y reptiles (McLean et al. 2002), y es el causante del declive poblacional de algunas especies de aves silvestres nativas en Norteamérica (Marra et al. 2004; LaDeau et al. 2008).

#### *Enfermedades transmitidas por vectores: factores condicionantes*

Las causas de la creciente expansión geográfica de las ETVs en el mundo son complejas y multifactoriales (Figura 1), y dicha dispersión está siendo ocasionada tanto por la expansión de vectores como por cambios en la ecología de los patógenos causales (Daszak et al. 2000). Alteraciones en el equilibrio del ecosistema y de su biocenosis conllevan variaciones en el escenario en el que interactúan patógenos, vectores y hospedadores, alterando consecuentemente la dinámica de las ETVs (Chivian 2002; Vora 2008). Estas alteraciones pueden generar ecosistemas desequilibrados en los que la



favorabilidad ambiental para ciertas especies de vectores artrópodos – o bien para los patógenos que portan – se vea incrementada (Kampen y Werner 2011), facilitando la propagación de dichos vectores o el establecimiento de especies foráneas. En una gran parte de los casos, las alteraciones en estos ecosistemas están relacionadas con factores antropogénicos, como la deforestación, la contaminación, el cambio climático, etc. Quizá por ello el factor más importante en las alteraciones en las poblaciones de artrópodos vectores de enfermedades sea el fenómeno de la globalización, incluyéndose en este fenómeno la movilización masiva de mercancías y animales, el movimiento de personas por turismo, negocios o por migraciones debidas a conflictos socio-políticos y económicos, los cambios en los usos del suelo, variaciones en los sistemas de almacenamiento de agua, el notable aumento de la población humana y el cambio climático global asociado a dichas actividades (Weiss y McMichael 2004; Pickering et al. 2012; Figura 1).



**Figura 1.** Visión esquemática de la complejidad de factores implicados en la dinámica de las enfermedades transmitidas por vectores. Adaptada de Daszak et al. (2000).

Existen numerosos ejemplos en la literatura científica sobre la implicación de alteraciones originadas por las actividades humanas en la aparición de ETVs. A pesar de la multifactorialidad en las alteraciones de las poblaciones de vectores y de sus patógenos. Algunos ejemplos de estos factores concretos serían:

La deforestación de bosques tropicales en América del Sur ocasionó un incremento en la favorabilidad de hábitats para la reproducción de anofelinos, lo que dio origen a numerosos brotes de malaria (Walsh et al. 1993). Harrus y Baneth (2005) y Louria (2007) señalaron que los charcos de agua en las zonas deforestadas son menos salinos y ácidos, propiciando el desarrollo de larvas de especies de mosquitos como *Anopheles darlingi*, el vector más eficaz de la malaria en el Amazonas. En numerosas zonas del mundo – África, Asia y América – el aumento de la transmisión de los agentes causales de la malaria ha coincidido con la deforestación. La deforestación

también se ha asociado con una mayor exposición a los vectores de la fiebre amarilla y la leishmaniasis (Patz et al. 2000; Molyneux, 2003; Vora et al.2008).

El incremento de las poblaciones de animales, tanto domésticos como silvestres, así como alteraciones en la biodiversidad y con ello en la predominancia de unas especies sobre otras (Ostfeld y Keesing 2000). Una mayor facilidad en el acceso a hospedadores y la presencia asegurada de una fuente de alimentación estable puede tener un efecto muy importante en las poblaciones de vectores, incrementando paralelamente la probabilidad de que los criadores de animales domésticos se conviertan a la par en fuente de alimento para los vectores (Patz et al. 2000). Las actividades humanas también conllevan alteraciones en la dinámica de las poblaciones de potenciales hospedadores silvestres que pueden condicionar la dinámica de los vectores. Existen numerosos ejemplos en la literatura científica, pero quizás uno de los más conocidos sea el del incremento de las poblaciones de garrapatas asociadas al incremento de los ungulados silvestres. En el Reino Unido la distribución y densidad de garrapatas de la especie *Ixodes ricinus* – principal vector en Europa de los patógenos causantes de la encefalitis transmitida por garrapatas, la enfermedad de Lyme o la anaplasmosis granulocítica humana – se ha incrementado en las últimas décadas en paralelo al incremento en la densidad y distribución de cérvidos silvestres, principalmente ciervo (*Cervus elaphus*) y corzo (*Capreolus capreolus*; Scharlemann et al. 2008; Ruiz-Fons y Gilbert 2010). Los hospedadores silvestres también pueden jugar un papel importante como hospedadores de dípteros, como parece evidenciar el hecho de que la favorabilidad ambiental para ungulados muestre un efecto positivo en la abundancia de *Culicoides imicola* en España (Acevedo et al. 2010).

El manejo de los sistemas fluviales también conlleva variaciones en la creación de reservorios artificiales que son especialmente propicios para la proliferación de

muchas especies de dípteros por su poca profundidad y amplia superficie (Molyneux 2003). La aparición de *Plasmodium falciparum* – una de las especies del género causantes de la malaria – en el desierto de Thar de la India coincidió con la construcción de una red de canales de riego (Harrus y Baneth 2005). Los campos de cultivo de arroz también constituyen uno de los hábitats más favorables para el desarrollo de mosquitos (Ponçon et al. 2007), por lo que el incremento de la demanda de este producto básico de subsistencia en muchas áreas del mundo debido al crecimiento demográfico de la población humana mundial conlleva aparejado el incremento de hábitats favorables para la reproducción de mosquitos.

La urbanización es otro factor importante de las alteraciones originadas por las actividades humanas en la aparición de ETVs y en gran medida origen de los factores anteriormente mencionados, y sobre todo en territorios naturales donde se ocasiona un incremento de la probabilidad de contacto del ser humano y de sus animales domésticos con vectores de enfermedades. La urbanización puede aumentar la exposición a algunos vectores de ETVs, como ha ocurrido con la fiebre amarilla, la tripanosomiasis, la enfermedad de Kyasanur o la enfermedad de Lyme (Ostfeld y Keesing 2000; Molyneux 2003; Sutherst 2004).

Los movimientos de hospedadores y mercancías son relevantes en la dinámica de los vectores artrópodos y de los patógenos que portan. Cohen y Powderly (2004) describieron la asociación entre diversos brotes de leishmaniasis en varias ciudades brasileñas y la inmigración de la población de zonas rurales a zonas urbanas. *Aedes albopictus* – uno de los vectores más importantes de ETVs – está en la actualidad en continua expansión por todo el mundo. En Europa una de las vías de introducción más importante de *Ae. albopictus* ha sido el incremento de las actividades comerciales y turísticas, ya que su propagación se ha asociado a la presencia de huevos en neumáticos

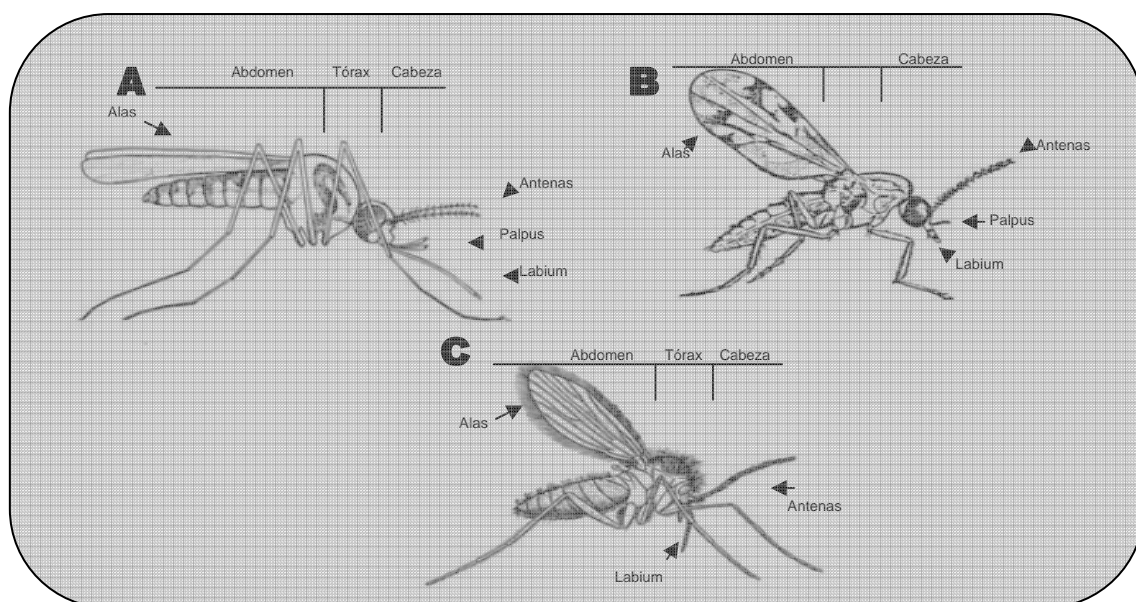
usados y productos de jardinería como el “Lucky bambu” (Reiter y Sprenger 1987; Madon et al. 2002) o asociado al transporte accidental de adultos en el interior de vehículos (Flacio et al. 2004).

El cambio climático global (CCG), sin lugar a dudas, es el factor de origen antropogénico más relevante en el cambio en la dinámica de las poblaciones de vectores y en la epidemiología de los patógenos que transmiten – y por ello es considerado como un factor con entidad propia en esta revisión. Esta estrecha relación tiene como origen el hecho de que factores climatológicos como la temperatura, la humedad y la precipitación son condicionantes clave de la biología y consecuentemente de la dinámica poblacional de los vectores artrópodos. Paralelamente, la replicación de los patógenos en los vectores y su transmisión a los hospedadores están en gran medida condicionadas por factores climáticos, por lo que la dinámica de las ETVs presenta una clara vinculación a los factores climáticos (Higgs et al. 2004). A modo de ejemplo, cabe señalar que el aumento de la temperatura y las precipitaciones favorecen la generación de hábitats y de condiciones ambientales favorables para el desarrollo de los mosquitos. Un aumento de alrededor de 2°C en la temperatura de la superficie del agua reduce el tiempo del desarrollo de larvas y pupas de *An. messeae* significativamente, resultando en un aumento del ciclo gonotrófico (período desde que la hembra se alimenta de sangre hasta que vuelve a alimentarse) y el número de generaciones (Becker 2009). Sin embargo, cabe señalar también que el efecto del CCG puede diferir significativamente entre regiones geográficamente próximas, por lo que sus efectos deben de ser predichos no sólo a escalas geográficas continentales, sino también a escalas regionales y locales.

*Vectores del orden Diptera de relevancia en salud pública y sanidad animal*

La mayoría de artrópodos que transmiten enfermedades pertenecen al orden Diptera (“dos alas”; Becker et al. 2010), cuyos individuos desarrollan una metamorfosis completa, generalmente pasando por cuatro fases bien definidas: huevo, larva, pupa y adulto. El orden de los dípteros está formado por varios miles de especies, pero sólo algunas de ellas tienen importancia médica y/o veterinaria (Tabla 1). La mayoría de estas especies pertenecen al suborden Nematocera, caracterizados por presentar largas antenas filiformes multi-segmentadas y con anatomía diversa en las piezas bucales, desde no funcionales a mordedoras y chupadoras (Gullan y Cranston 2005). Dentro del suborden Nematocera, los principales vectores que transmiten enfermedades son los culícidos (familia *Culicidae*), los *Culicoides* o “jejenes” (familia *Ceratopogonidae*), los flebótomos (familia *Psychodidae*) y los simúlidos (familia *Simulidae*; Borkent 2005; Figura 2; Tabla1). En este trabajo de Tesis Doctoral se han estudiado las tres primeras familias de dípteros y por ello la familia *Simuliade* no será tratada en detalle.

**Figura 2.** Morfología general de dípteros de las familias: A) *Culicidae*, B) *Ceratopogonidae* C) *Psychodidae*. Marquardt (2005).



## *Culícidos*

De entre los diferentes grupos de artrópodos hematófagos capaces de transmitir enfermedades, los mosquitos o culícidos – considerando el término “mosquito” en su acepción anglosajona referente únicamente a los dípteros de la familia *Culicidae* – son los dípteros más importantes en salud pública y sanidad animal (Eldridge 2005). Se considera que los culícidos son los principales organismos transmisores de patógenos al ser humano (Estrada-Peña y Jongejan 1999). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en el año 2006 aproximadamente 247 millones de casos clínicos y alrededor de un millón de muertes en el mundo fueron causadas por enfermedades transmitidas por mosquitos (OMS 2008). Posiblemente los mosquitos sean las especies del reino animal que mayor morbilidad y mortalidad causan en el ser humano, generando además elevadísimos costes económicos derivados de las necesidades de inversión en su control y de sus efectos adversos derivados (Becker et al. 2010; Figura 2).

### 1. Clasificación taxonómica, biología y ecología de los culícidos

Dentro de la familia *Culicidae* se incluyen numerosos géneros, siendo los más relevantes desde el punto de vista sanitario *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* y *Culiseta*. La biología de los culícidos presenta una serie de adaptaciones extraordinarias para prosperar en ambientes altamente heterogéneos a pesar de que los requerimientos básicos para su reproducción son similares. Algunas especies pueden colonizar temporal o permanentemente tanto sitios naturales, urbanos y rurales, como puntos contaminados o limpios (Becker et al. 2010), si bien ciertas especies presentan restricciones ambientales mucho más severas. Se da la circunstancia que aquellas especies con mayor capacidad adaptativa son las especies con mayor potencial expansivo y por ende, con mayor potencial epidemiológico.

**Tabla 1.** Especies de vectores de las familias *Culicidae*, *Ceratopogonidae* y *Psychodidae* de relevancia en salud pública y sanidad animal en España.

Familia	Especie	Etiología	Familia	Agente etiológico	Enfermedad	Hospedadores	Estado
<i>Culicidae</i>	<i>Aedes Anopheles</i> , <i>Culex</i>		<i>Flaviviridae</i>	Virus West Nile	West Nile	Humanos, equinos y aves	Descrita
	<i>Culiseta</i> , <i>Ochlerotatus</i>		<i>Flaviviridae</i>	Virus del dengue	Dengue	Humanos	Importada
	<i>Ae. aegypti</i> *, <i>Ae. albopictus</i>		<i>Flaviviridae</i>	Virus de la fiebre amarilla	Fiebre amarilla	Humanos, primates	Importada
	<i>Ae. aegypti</i> *, <i>Ae. albopictus</i> , <i>Ae. vittatus</i>		<i>Flaviviridae</i>	Virus de Usutu	Usutu	Aves	Descrita
	<i>Culex</i> spp.		<i>Flaviviridae</i>	Virus de Bagaza	Bagaza	Aves	Descrita
	<i>Aedes</i> spp., <i>Culex</i> spp.	Virica	<i>Togaviridae</i>	Virus de Chikungunya	Chikungunya	Humanos, primates y aves	Importada
	<i>Ae. aegypti</i>		<i>Bunyaviridae</i>	Virus de la fiebre del Valle del Rift	Fiebre del Valle del Rift	Humanos	Ausente
	<i>Ae. aegypti</i> *, <i>Cx. pipiens</i>		<i>Togaviridae</i>	Virus de Sindbis	Sindbis	Aves	Importada
	<i>Culex</i> spp.		<i>Bunyaviridae</i>	Virus de Tahyna	Tahyna	Roedores, lacértidos	Importada
	<i>Aedes</i> spp., <i>Anopheles</i> spp., <i>Culex</i> spp.	Bacteriana	<i>Francisellaceae</i>	<i>Francisella tularensis</i>	Tularemia	Humanos, liebres y micromamíferos	Descrita
	<i>Aedes</i> spp., <i>Anopheles</i> spp., <i>Culex</i> spp.		<i>Plasmodiidae</i>	<i>Plasmodium</i> spp	Malaria	Humanos, primates	Descrita
	<i>Anopheles</i> spp.		<i>Onchoceridae</i>	<i>Setaria labitopapillosa</i>	Filariasis	Bovinos	Descrita
	<i>Aedes</i> spp.		<i>Onchoceridae</i>	<i>Dirofilaria immitis</i>	Filariasis canina	Cánidos	Descrita
	<i>Aedes</i> spp., <i>Anopheles</i> spp., <i>Culex</i> spp., <i>Ochlerotatus</i> spp.	Parasitaria	<i>Onchoceridae</i>	<i>Wuchereria bancrofti</i>	Filariasis linfática	Fauna silvestre, humanos	Descrita
	<i>Aedes</i> spp., <i>Anopheles</i> spp., <i>Culex</i> spp., <i>Ochlerotatus</i> spp.		<i>Reoviridae</i>	Virus de la lengua azul	Lengua azul	Rumiantes y carnívoros	Descrita
<i>Culicoides imicola</i> , <i>C. obsolenus</i> , <i>C. punctatus</i> , <i>C. pulicaris</i>		<i>Reoviridae</i>	Virus de la peste equina africana	Peste equina africana	Equinos	Descrita	
<i>C. imicola</i> , <i>C. pulicaris</i>		<i>Reoviridae</i>	Virus de enfermedad epizootica hemorrágica	Enfermedad epizootica hemorrágica	Rumiantes	Ausente	
<i>Culicoides</i> spp., <i>C. varipennis</i>	Virica	<i>Bunyaviridae</i>	Virus de Schmallenberg	Schmallenberg	Rumiantes	Descrita	
<i>Culicoides</i> spp.		<i>Bunyaviridae</i>	Virus de Oropouche	Fiebre de Oropouche	Humanos	Ausente	
<i>Culicoides paraensis</i>		<i>Bunyaviridae</i>					
<i>Ceratopogonidae</i>							



Familia	Especie	Etiología	Familia	Agente etiológico	Enfermedad	Hospedadores	Estado
<i>Ceratopogonidae</i>	<i>Culicoides</i> spp.	Bacteriana	<i>Francisellaceae</i>	<i>Francisella tularensis</i>	Tularemia	Humanos, liebres y micromamíferos	Descrita
	<i>Culicoides</i> spp.	Parasitaria	<i>Leucocytozoidae</i>	<i>Leucocytozoon</i> sp.	Parasitosis	Aves	Descrita
	<i>Culicoides</i> spp.		<i>Filarioidea</i>	<i>Mansonella ozzardi</i>	Filariasis	Humanos	Desconocido
<i>Psychodidae</i>	<i>Ph. perniciosus</i>	Virica	<i>Bunyaviridae</i>	Virus de la fiebre de Nápoles	Fiebre de Nápoles	Humanos	Descrita
	<i>Ph. perniciosus</i>		<i>Bunyaviridae</i>	Virus de la fiebre de Toscana	Fiebre de Toscana	Humanos, murciélagos	Descrita
	<i>Ph. papatasi</i>		<i>Bunyaviridae</i>	Virus de la fiebre de Sicilia	Fiebre de Sicilia	Humanos, micromamíferos	Descrita
	<i>Ph. papatasi</i>	Bacteriana	<i>Rhabdoviridae</i>	Virus de Chandipura	Chandipura	Humanos, erizos	Ausente
	<i>Phebotomus</i> spp.		<i>Francisellaceae</i>	<i>Francisella tularensis</i>	Tularemia	Humanos, liebres y micromamíferos	Descrita
	<i>Ph. perniciosus, Ph. ariasi</i>	Parasitaria	<i>Trypanosomatidae</i>	<i>L. infantum</i>	Leishmaniasis cutánea y visceral	Humanos, cánidos, carnívoros silvestres y lagomorfos	Descrita
	<i>Ph. perniciosus</i>		<i>Trypanosomatidae</i>	<i>L. donovani</i>	Leishmaniasis visceral	Humanos	Ausente
	<i>Phebotomus papatasi</i>		<i>Trypanosomatidae</i>	<i>L. major</i>	Leishmaniasis cutánea	Humanos y roedores	Ausente

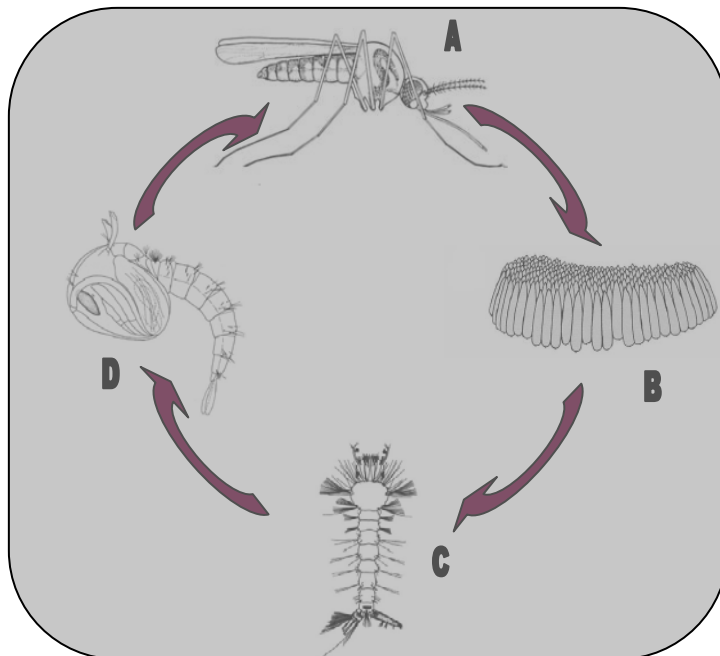
\* Actualmente *Ae. aegypti* no está descrito en España.

□ Situación de la enfermedad con respecto a España; Descrita: Registrada alguna vez en España, Importada: Los casos descritos son importados, Ausente: No se ha descrito anteriormente (Eldridge 2004; Munstermann 2004; Becker et al. 2010; Depaquit et al. 2010).

El tamaño de los adultos varía según las especies, pero generalmente no superan los 15 mm. Las hembras de los culícidos son hematófagas obligadas para completar el desarrollo de los huevos, mientras los machos se alimentan habitualmente de jugos vegetales (Vinogradova 2000). Los hábitos de puesta de huevos de las hembras varían ampliamente de una especie a otra. La mayoría de los culícidos requiere hábitats acuáticos para su desarrollo, y por ello las hembras necesitan de una superficie acuática en la que depositar sus huevos. Sin embargo, algunas hembras de los géneros *Aedes* y *Ochlerotatus* pueden depositar sus huevos en suelo húmedo sin el requerimiento de un cuerpo de agua, si bien estas zonas de oviposición deben de inundarse a posteriori para que se produzca la eclosión y el desarrollo de las larvas (Bueno-Marí y Jiménez-Peydró 2011). El hábitat condiciona por ende el desarrollo de los mosquitos. De forma general, los mosquitos aprovechan una amplia variedad de hábitats acuáticos para el desarrollo de las larvas, desde pozas naturales creadas tras las precipitaciones hasta pequeños depósitos de agua como los platos que se colocan bajo las macetas, pasando por grandes superficies de agua como los humedales (Beeuwkes et al. 2011). La mayor parte de las especies de mosquitos desarrollan sus larvas en agua dulce y limpia (Ofulla et al. 2010). Sin embargo, algunas especies toleran aguas con diversos grados de contaminación como tanques sépticos y de drenaje con altas concentraciones de contaminación orgánica o aguas residuales de regadíos con altas concentraciones de fitosanitarios. Algunas especies, como es el caso de *Ochlerotatus caspius*, están adaptadas a ambientes salinos donde son capaces de reproducirse (Azzam 2012; Clavero 1946). De forma general, los cuerpos de agua seleccionados por los culícidos para reproducirse son de aguas someras y ricas en nutrientes, mientras que evitan masas de agua profundas y abiertas que proporcionan poca protección contra depredadores, como peces y larvas de

otros insectos, y contra el arrastre de estados inmaduros y de nutrientes por las corrientes (Clements 1992).

Los huevos depositados en agua emergen en un día o dos, pero los huevos puestos en la superficie del suelo no eclosionan hasta que la superficie es inundada (meses o incluso años). Después de la eclosión se desarrollan cuatro estadios larvarios y una fase de pupa que dura de 1 a 2 días y que dará lugar al estadio adulto (Becker et al. 2010; Figura 3). En verano, con temperaturas cálidas, todo el ciclo de desarrollo desde huevo a adulto puede ser completado en tan sólo 10 días. En función de la capacidad de una especie, subespecie o biotipo de criar una o más generaciones durante un ciclo anual, se clasifica a los mosquitos en univoltinos – una generación por año – o multivoltinos – varias generaciones por año. El potencial colonizador de taxones multivoltinos es por ende superior que el de especies univoltinas (Eldridge 2005).



**Figura 3.** Etapas del ciclo biológico general de los culícidos: A) adulto; B) huevos; C) larva con 4 estadios (culicino); y D) pupa. Adaptación de Becker et al. (2010).

El tiempo necesario para el desarrollo de los estadios larvarios depende de factores climáticos como la temperatura, la precipitación y la humedad relativa, que influyen directamente en la ecología, la fisiología y consecuentemente la abundancia de los culícidos (Bidle 1974; Service 1978; Alto et al. 2012). Por ejemplo, en el caso de *Culex pipiens* un ascenso de la temperatura no sólo activa e incrementa el desarrollo de las larvas, sino que también puede aumentar el número de veces que la hembra necesita alimentarse de sangre para la ovogénesis (Becker et al. 2010). Ello aumentaría el número de picaduras en hospedadores vertebrados sobre los que se alimenta, aumentando con ello la probabilidad de ser infectada y de transmitir un agente patógeno de un huésped a otro (Snow 1999; Becker 2008). Para evitar las condiciones climáticas desfavorables (generalmente las bajas temperaturas en invierno), los culícidos pueden desarrollar un fenómeno común a numerosos artrópodos conocido como diapausa. Dicho proceso constituye una adaptación fisiológica de los insectos mediante el cual los procesos reproductivos y el comportamiento se alteran para permitir la supervivencia del insecto ante condiciones ambientales adversas.

Finalmente los hospedadores son el otro gran factor que condiciona la presencia de los mosquitos en zonas concretas, pero sobre todo su abundancia (Patz et al. 2000). La especificidad de hospedador es variable entre las diferentes especies de culícidos, e incluso entre subespecies y biotipos dentro de una misma especie (Apperson et al. 2004). Algunas especies presentan un grado muy elevado de especificidad de hospedador, caso de *Ae. triseriatus* con ardillas (*Tamias* spp.) en Estados Unidos (Issa y Heather 2009), mientras otras, por ejemplo las especies del complejo *Cx. pipiens*, se alimentan de aquellos hospedadores que encuentran con mayor facilidad (Kilpatrick et al. 2007). Cabe también señalar que muchas especies de mosquitos se han especializado en reproducirse y alimentarse en ambientes urbanos donde las personas somos su

principal fuente de alimento, constituyéndose en las especies con mayor potencial epidemiológico en salud pública. Un ejemplo claro es el de *Ae. albopictus*, el mosquito tigre, o el de algunas especies transmisoras de malaria como *An. labranchiae* (Bueno-Marí et al. 2010). Es por ello que el ciclo de vida de los mosquitos está íntimamente ligado a la dinámica poblacional de sus hospedadores.

## 2. Patógenos transmitidos por culícidos

Los agentes patógenos transmitidos por culícidos son muy diversos y pueden incluir virus, bacterias y parásitos (Rosenberg y Ben Beard 2011). Dentro del grupo de los virus, los dos arbovirus más importantes para el ser humano pueden ser el virus de la fiebre amarilla y el virus del dengue (Weissenböck et al. 2010). Gould y Solomon (2008) estimaron que la fiebre amarilla causa en humanos alrededor de 200000 casos de enfermos y 30000 muertes al año (Tabla 1). El virus del dengue causa en humanos la enfermedad del dengue o “fiebre quebrantahuesos”. La incidencia mundial de dengue se ha incrementado en la última década, especialmente asociado con el aumento del intercambio internacional de pasajeros y mercancías (Becker et al. 2010). La OMS (2008) y Gratz (1999) indican que actualmente alrededor del 40% de la población mundial vive bajo riesgo de infección por el virus del dengue. Además del virus del dengue y del virus de la fiebre amarilla existen otros arbovirus transmitidos por mosquitos de gran relevancia como el virus de West Nile (WN), causante de una enfermedad que afecta principalmente a aves, equinos y humanos. El virus de WN ha causado múltiples brotes a nivel mundial desde hace más de 60 años (Calistri et al. 2010). Sin embargo, en 1999 surgió un brote en EEUU que resultó alarmante por su rápida distribución, su elevada morbilidad en humanos y una drástica tasa de mortalidad en diversas especies de aves (Lanciotti et al. 1999). Otro ejemplo es el virus de Chikungunya (CH), un patógeno originario y endémico en África y Asia, pero que en

2007 apareció por primera vez en el sur de Europa (Rezza et al. 2007). Un brote que afectó a más de 2 millones de personas entre 2006 y 2007 en la India hizo saltar las alarmas sobre el virus de CH a nivel mundial y sobre su potencial patógeno. En la actualidad, el agente transmitido por culícidos que mayor preocupación ocasiona en las autoridades sanitarias de la Unión Europea es el virus de la fiebre del valle del Rift (FVR). El virus de la FVR ocasiona la enfermedad de su mismo nombre, una zoonosis que afecta principalmente a los rumiantes cursando con elevada mortalidad en neonatos (Chevalier et al. 2010). Los brotes de FVR en el continente africano se asocian generalmente a episodios meteorológicos de fuertes lluvias e inundaciones que dan como resultado la proliferación de mosquitos. Uno de los brotes más devastadores que se han registrado hasta ahora ha sido el de Egipto entre 1977 y 1978 (Turell et al. 2010). Existen más de 30 especies de vectores involucrados en su transmisión, siendo los más importantes algunas especies de los géneros *Aedes* y *Culex* (Linthicum et al. 1985). También se ha descrito el posible papel de otros dípteros, como los jejenes del género *Culicoides* (Glick 1990) o como los flebótomos (Turell y Perkins 1990) como potenciales vectores del virus de la FVR. Se ha especulado que si la FVR fuese introducida en Europa, culícidos como *Ae. vexans* y *Cx. pipiens* podrían jugar un papel importante como vectores en la cuenca Mediterránea (Turell 1989).

Así mismo, los culícidos son capaces de transmitir otros arbovirus que afectan a humanos y animales tanto domésticos como silvestres, como el virus de la encefalitis japonesa (Weng et al. 2000), el virus de Saint Louis (Killpatrick et al. 2005), el virus Sindbis (Dohm et al. 1995), el virus Usutu (Williams et al. 1964), el virus Bagaza (Traore-Lamizana et al. 1994) o el virus Tahyna (Bardos y Danielova et al. 1959) entre otros (Tabla 1). Además, Christenson (1984) y Eliasson et al. (2002) mencionan que los culícidos han sido identificados y vinculados a brotes epidémicos de agentes bacterianos

como *Francisella tularensis* – agente causal de la tularemia tanto en animales como en humanos. Las enfermedades parasitarias también entran dentro del rol epidemiológico de los culícidos, estando principalmente asociadas al género *Anopheles*. El más claro ejemplo de enfermedad parasitaria – entendida en terminología clásica de las ciencias veterinarias – es el paludismo o malaria, causada por protozoos del género *Plasmodium*, principalmente *P. falciparum* en zonas tropicales y *P. vivax* en zonas templadas (Peralta et al. 2010). La malaria sigue ostentado el “honor” de ser la ETV más importante a nivel mundial (OMS 2008), ya que es responsable de al menos 300 millones de casos de infección y más de un millón de muertes humanas al año. Así mismo, se considera que alrededor de 3300 millones de personas viven en constante riesgo de infectarse por malaria (OMS 2008). Algunas especies de culícidos de los géneros *Culex*, *Aedes* y *Anopheles* tienen la capacidad de transmitir nematodos, como es el caso de *Dirofilaria immitis* (Pampiglione et al. 1995; Cancrini et al. 2007), el agente causal de la dirofilariasis canina y humana. Actualmente en la cuenca Mediterránea los casos de dirofilariasis están en aumento ocasionados por *D. repens* (agente etiológico de la infección subcutánea) que afecta principalmente a cánidos y félidos (Pampiglione et al. 2000; Simon et al. 2005). Los culícidos también son capaces de transmitir otra especie de filaria – *Setaria labiatopapillosa* – que afecta principalmente a bovinos, aunque también puede afectar a otros mamíferos (Cancrini et al. 2007; Reusken et al. 2010; Tabla 1).

### *Culicoides*

Conocidos vulgarmente como “jejenes”, los ceratopogónidos constituyen una numerosa familia de dípteros. Tienen una terrible reputación debido a las desagradables picaduras que ocasionan a personas y animales, además de ser vectores de enfermedades muy

relevantes como la lengua azul (Borkent 2005). A diferencia de los culícidos, la mayor parte de los ceratopogónidos no son relevantes desde el punto de vista de salud pública y sanidad animal, y juegan un papel ecológico relevante como polinizadores, como parásitos, e incluso depredadores, de otros insectos y como base trófica para muchos insectívoros (Eldridge 2005). Dentro de los dípteros, la relevancia sanitaria de los ceratopogónidos es mayor en sanidad animal que en salud pública, ya que las enfermedades más relevantes transmitidas por estos insectos afectan a animales y sólo unas pocas de las más conocidas son zoonóticas (ver Tabla 1). Dentro de los ceratopogónidos, el género *Culicoides* y en concreto las especies clasificadas en el subgénero *Avaritia* son los que mayor relevancia presentan desde el punto de vista sanitario. Por esta razón, la revisión en esta Tesis Doctoral, cuyo eje central es la prevención de riesgos sanitarios a través del conocimiento entomológico, se centrará principalmente en el género *Culicoides*, obviando muchos aspectos de la biología y ecología de otros ceratopogónidos.

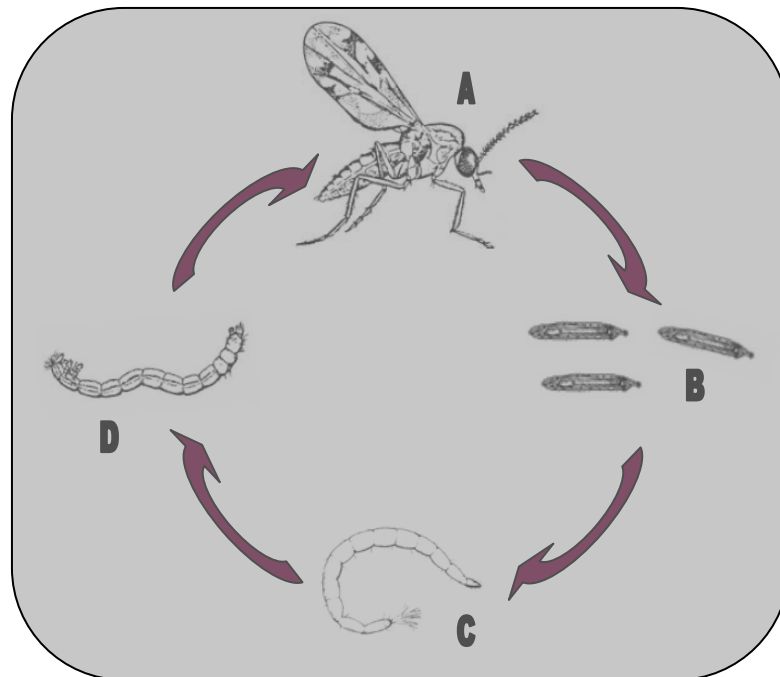
### 1. Clasificación taxonómica, biología y ecología de los *Culicoides*

Actualmente existen más de 5000 especies descritas dentro de la familia *Ceratopogonidae*, clasificadas en cuatro subfamilias: *Forcipomyiinae*, *Dasyheleinae*, *Ceratopogoninae* y *Leptoconopinae*. Dentro de la subfamilia *Ceratopogoninae* se incluye el género *Culicoides*, en la tribu Culicoidini, con alrededor de 1400 especies conocidas. Las especies de esta familia están presentes en casi todas las regiones terrestres del planeta, desde zonas costeras hasta zonas de alta montaña, y desde los trópicos hasta el Ártico (Eldridge 2005). En general se trata de especies cuya biología y ecología han sido poco estudiadas. En regiones como América del Norte y Europa existen problemas para clasificarlas taxonómicamente, sin hablar de las especies de



*Culicoides* del centro y sur de América, Asia y África, en donde el número de especies es notablemente más abundante (Eldridge 2005).

Los *Culicoides* miden alrededor de 1,5 a 3 mm de longitud. Las especies del género *Culicoides* desarrollan un ciclo de vida básico que incluye una etapa de huevo, cuatro fases en estadio de larva, una fase de pupa y una fase adulta (Figura 4). La duración del desarrollo completo desde huevo hasta adulto varía con la especie y el hábitat, pero sobre todo con la temperatura ambiental. Con temperaturas entre 28 y 35°C el ciclo completo dura 15 días, pero al disminuir la temperatura el ciclo se puede prolongar, llegando a tardar hasta siete meses en realizar todo el ciclo biológico.



**Figura 4.** Etapas del ciclo biológico general de especies del género *Culicoides*: A) adulto; B) huevo; C) larva con 4 estados; y D) pupa. Adaptado de Eldridge (2005).

Los lugares de puesta de huevos seleccionados por los *Culicoides* varían de una especie a otra. En general necesitan abundante materia orgánica que sirva de nutriente a las bacterias, algas o nematodos de vida libre que son la base de la alimentación de los estadios inmaduros. Estos hábitats de cría varían mucho, pudiendo ser desde zonas encharcadas, agujeros de árboles con restos vegetales, frutos en descomposición o incluso troncos de árboles en descomposición (Kirkeby et al. 2009). Algunas larvas de *Culicoides* pueden desarrollarse con abundancias de más de 10.000 larvas/m<sup>2</sup> en suelos húmedos o con estiércol de animales (Eldridge 2005). Dos de las especies más importantes desde el punto de vista de la sanidad animal, *C. imicola* y *C. obsoletus* presentan diferencias en sus preferencias de hábitat para la puesta de huevos. Mientras *C. imicola* busca zonas húmedas con abundante materia orgánica, evitando zonas donde el drenaje tanto de humedad – p. ej., terrenos arenosos – como de nutrientes – p. ej., zonas de elevada pendiente – sea elevado e impida el correcto desarrollo de los estados inmaduros, *C. obsoletus* selecciona excrementos de animales, generalmente de vacuno, como lugar óptimo para el desarrollo de su ciclo de vida (Meiswinkel et al. 2004). Esto condiciona en gran medida la distribución espacial de estas especies y con ello los riesgos sanitarios a los que los vertebrados están expuestos en función de su localización geográfica.

La actividad circadiana de numerosas especies del género *Culicoides* – especialmente en regiones en las que el estrés hídrico es elevado – suele comenzar en el ocaso del día, aprovechando la disminución de la temperatura y el consecuente incremento de la humedad ambiental. Sin embargo, algunas especies como *C. impunctatus* (Bhasin et al. 2000) mantienen la actividad durante el día. La actividad estacional de los *Culicoides* viene condicionada principalmente por factores ambientales predominantes íntimamente asociados a la biología de cada especie. Así, mientras los

picos de abundancia anual de *C. obsoletus* y *C. pulicaris* acontecen entre la primavera y principios del verano (Lucientes et al. 2008), el pico de actividad anual de *C. imicola* se retrasa hasta finales de verano y principios de otoño (Miranda et al. 2004). Este es un factor muy importante desde el punto de vista epidemiológico, ya que estos patrones fenológicos determinan en gran medida el riesgo de los hospedadores vertebrados de estar expuestos a los patógenos transmitidos por estos jejenes. El rango de acción de los jejenes del género *Culicoides* es variable, desde unos pocos a cientos de metros desde el lugar de eclosión de los adultos (Eldridge 2005). Sin embargo, y a diferencia de otros dípteros, algunas especies del género son capaces de ascender cientos de metros y ser arrastrados por corrientes de aire. Se ha descrito que ante la combinación idónea de factores ambientales – condiciones de temperatura y humedad relativa adecuadas– y la formación de corrientes ascendentes de aire, los *Culicoides* pueden ser transportados vivos a distancias de más de 700 kilómetros desde sus lugares de origen (Hendrickx et al. 2008). Esto les otorga a estas especies la capacidad de desplazarse entre diferentes territorios, entre diferentes países o incluso de un continente a otro, colonizando nuevas zonas e incrementando el riesgo de introducción de patógenos de zonas endémicas a zonas potencialmente adecuadas para los mismos (Hendrickx et al. 2008). Las implicaciones epidemiológicas de este acontecimiento ecológico son por ello de una magnitud colosal, y son las que han condicionado tradicionalmente la expansión geográfica del virus de la lengua azul en muchos países europeos de la cuenca mediterránea e incluso en el Canal de la Mancha (Sanders et al. 2011).

Como algunos otros dípteros, solamente las hembras son hematófagas mientras que los machos se alimentan principalmente sobre plantas. Las hembras son oportunistas y la selección de hospedador depende principalmente de su disponibilidad, es decir de su abundancia con respecto al resto de vertebrados en el ecosistema, en la

zona de reproducción (Eldridge 2005). El rango de hospedadores de los que se alimentan los *Culicoides* es tan amplio que puede incluir desde tortugas marinas hasta seres humanos (Tempelis 1975). Sin embargo, en ocasiones se establecen patrones de preferencia por hospedadores concretos aún cuando otros vertebrados están disponibles, como se evidenció en *Culicoides obsoletus* y *C. pulicaris* en explotaciones ganaderas alemanas (Bartsch et al. 2009).

## 2. Patógenos transmitidos por *Culicoides*

Los *Culicoides* son reconocidos principalmente por ser capaces de transmitir un gran número de patógenos, desde virus a protozoos y nematodos, que pueden tener un elevado impacto sanitario, tanto en personas como a animales (Borkent 2005). Sin embargo, como anteriormente se comentó, los patógenos transmitidos por jejenes de este género tienen un mayor impacto en sanidad animal que en salud pública.

De entre todos los agentes infecciosos que pueden transmitir los jejenes del género *Culicoides*, sin duda el virus de la lengua azul (LA) – clasificado en el género *Orbivirus* de la familia *Reoviridae* – es el que mayor impacto global genera por sus efectos en la producción ganadera de rumiantes y por las restricciones comerciales (Carpenter et al. 2008). La lengua azul (LA) es una enfermedad que afecta a camélidos y rumiantes tanto silvestres como domésticos. La LA se caracteriza por afectar a mucosas, principalmente bucal y nasal, produciendo síntomas como fiebre, debilidad muscular, salivación excesiva, edema facial y cianosis lingual (razón de su nombre) y con frecuencia la muerte (Schwartz-Cornil et al. 2008). El virus de la LA es un virus originario del sur del continente africano, en el que alrededor de 25 serotipos diferentes están presentes (MacLachlan et al. 2009). El ciclo de vida endémico de este virus en el sur de África comprende la presencia de reservorios tanto domésticos (principalmente

vacuno) como silvestres (rumiantes silvestres principalmente) y una especie principal de vector, *C. imicola* (Meiswinkel et al. 2004). Desde sus cuarteles africanos el virus de la LA ha realizado numerosas incursiones a otros países africanos y al resto de continentes, apareciendo en todo el continente americano donde *C. sonorensis* en Norteamérica y *C. insignis* en Centro y Suramérica son los principales vectores, en Oceanía y el continente asiático – con *C. brevitarsis* como vector principal – y en Europa – donde *C. imicola* y algunas especies de los grupos *C. obsoletus* y *C. pulicaris* son vectores (Tabachnick 2010). Las numerosas incursiones del virus al continente Europeo han acabado en la consecución del establecimiento de ciclos endémicos del virus en países de la cuenca mediterránea (García-Bocanegra et al. 2011; RASVE 2011; Falconi et al. 2011), donde animales domésticos y silvestres actúan como reservorios y numerosas especies de jejenes del género *Culicoides* actúan como vectores. El brote de LA que afectó a la península ibérica en los años 50 del s. XX causó la muerte de 46000 ovinos en Portugal y 133000 en España (López y Sánchez-Botija 1958). A partir de 1998 la LA ha re-emergido en la cuenca mediterránea y por primera vez emergió en el centro-oeste y norte de Europa, traspasando la mítica barrera longitudinal de los 40°N establecida a priori en base a la distribución de *C. imicola*. Las numerosas incursiones históricas del virus de la LA en Europa han estado ocasionadas por diferentes serotipos, de los cuales se han detectado un total de diez: 1, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 15 y 16, algunos de ellos de origen vacunal. Estos brotes han causado la muerte de millones de rumiantes domésticos, declarándose a la Organización Internacional de Epizootías (OIE) más de 110000 brotes entre 1998 y 2010 (Meiswinkel et al. 2007; Guis et al. 2012). Velthuis et al. (2010) indicaron que las pérdidas económicas solamente por el serotipo 8 ascendieron a más de 32 millones de euros en 2006 y 163,8 millones de euros en 2007.

Otra enfermedad vírica transmitida por *Culicoides* de origen africano es la peste equina africana (PEA). La PEA, causada por un *Orbivirus* de la familia *Reoviridae*, es endémica en el continente africano y es responsable de una elevada mortalidad en caballos (*Equus caballus*), burros (*Equus africanus asinus*) y mulos (*E. caballus* x *E. a. asinus*), tanto en zonas enzoóticas como en zonas epizooticas. La PEA puede cursar con tasas de mortalidad superiores al 90% (Mellor y Hamblin 2004). Los reservorios silvestres principales en el continente africano son équidos silvestres, como cebras y asnos, que no manifiestan sintomatología alguna tras la infección por el virus pero desarrollan elevadas cargas virales en sangre. El virus de la PEA es transmitido por jejenes del género *Culicoides*, siendo el vector más importante *C. imicola* (Coetzer y Tustin 2004), aunque otros vectores han sido responsables en zonas fuera del continente africano, como en Oriente Medio, la India y Pakistán. El serotipo 9 del virus de la PEA apareció por vez primera fuera de sus cuarteles africanos en España en el año 1966. Posteriormente, ya en el año 1987, el serotipo 4 fue introducido a la península ibérica, causando devastadores efectos en équidos domésticos en España y Portugal (Mellor y Hamblin 2004). Esta serie de brotes puso además en evidencia que otras especies paleárticas de jejenes aparte de *C. imicola*, como *C. obsoletus* y *C. pulicaris*, podían contribuir a la transmisión de la PEA en Europa (Mellor et al. 1990). En la actualidad el riesgo de reintroducción y reemergencia de la PEA a territorio europeo desde África es elevado, constituyendo una constante preocupación para las autoridades responsables de la sanidad animal en Europa (Gale et al. 2009). De momento, no se conoce si algún animal silvestre europeo podría tener algún papel en la epidemiología del virus de la PEA, si bien la ausencia de équidos silvestres en Europa parece indicar que un ciclo silvestre es poco probable.

Otro *Orbivirus* muy cercano al de la LA es el virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (EHE), que comparte con la LA su tropismo por los jejenes del género *Culicoides*. La EHE afecta principalmente a rumiantes silvestres y domésticos donde es capaz de provocar un cuadro clínico que en ocasiones es de curso mortal. El virus de la EHE es originario también del continente africano, pero ha sido introducido en numerosas regiones del mundo como en el continente americano, en Asia y en Australia (MacLachlan y Guthrie 2010). En Norteamérica, Dubay et al. (2006) informó que una de las causas de la drástica reducción de la población de berrendo (*Antilocapra americana*) en Arizona era la mortalidad por EHE. En Europa no se ha descrito hasta el momento la presencia del virus, aunque existen poblaciones estables de *Culicoides* capaces de transmitir la EHE como *C. obsoletus*, *C. imicola*, *C. pusilus* y *C. pulicaris* (Savini et al. 2011). Por lo anterior, las autoridades veterinarias europeas en los últimos años han permanecido alerta ante los brotes que en el verano de 2006 aparecieron en el norte de África y en el 2007 en Turquía (Temizel et al. 2009). Además, especies de rumiantes silvestres europeos como el ciervo rojo (*Cervus elaphus*), el gamo (*Dama dama*) y el corzo (*Capreolus capreolus*) han sido experimentalmente capaces de infectarse por el virus de la EHE (Gibbs y Lawman 1977). Es, por lo tanto, de especial relevancia cuestionarse el papel de los rumiantes silvestres europeos en el ciclo epidemiológico de la EHE en una supuesta entrada del virus a Europa (EFSA 2012).

En el año 2011 se registraron numerosos brotes en Alemania, Holanda y Bélgica de abortos por malformaciones fetales en ovino y bovino (Hoffmann et al. 2012). Desde estos países los brotes de abortos por malformación fetal se extendieron al Reino Unido, Luxemburgo, Francia, Italia y España. Se identificó un nuevo virus del género *Orthobunyavirus*, muy próximo al virus Akabane – agente causal de abortos y malformaciones congénitas en rumiantes (Jennings y Mellor 1989) –, al virus Aino y al

virus Shamonda (catalogados dentro del grupo Simbu de la familia *Bunyaviridae*; Van den Brom et al. 2012), que tomó el nombre de la localidad alemana donde fue descrita la enfermedad por vez primera, pasando a conocerse como el virus Schmallerberg. Se trata de la primera descripción mundial de este virus del que de momento se desconoce su origen. Desde su aparición, y debido a su homología con el virus Akabane (Lievaart-Peterson et al. 2012) y al patrón geográfico de distribución similar al serotipo 8 de la lengua azul, se señaló a jejenos del género *Culicoides* como vectores. Sin embargo, a día de hoy aún no se ha podido establecer un vínculo claro entre *Culicoides* y el virus Schmallerberg, por lo que las especies de *Culicoides* presuntamente implicadas aún no son bien conocidas. Además, como en otros virus transmitidos por *Culicoides*, la transmisión materno-filial y por otras vías entre animales es posible, introduciendo mayor complejidad en averiguar el papel real de los jejenos en su epidemiología. Algunos virus del grupo Simbu han sido aislados de insectos hematófagos, aves de corral y mamíferos en África, Asia, Australia y América (Yanase et al. 2005). Otro miembro del grupo Simbu es el virus de Oropouche, que causa una de las más importantes enfermedades tropicales por arbovirus de los seres humanos en América. Aunque generalmente no es fatal, puede producir síntomas graves de tipo gripal, con fiebre y vómitos de hasta 2 semanas (Mourao et al. 2009). Si bien hasta ahora ésta ETVs no es relevante en Europa, puede representar una enfermedad de riesgo como turista en las regiones endémicas.

De entre las enfermedades parasitarias transmitidas por *Culicoides*, quizás el protozoo más importante sea *Leucocytozoon caulleryi*. Este agente protozoario afecta a aves de corral en el sudeste asiático, causando cuadros severos de hemorragia aguda con tasas de mortalidad superiores al 20% (Matsumoto et al. 2009). Las filariasis, a su vez, son de gran relevancia entre las enfermedades transmitidas por *Culicoides*.



Principalmente, tres especies de filarias son transmitidas a los seres humanos, pero sólo *Manzonella ozzardi* parece ser levemente patógena y su infección se ha registrado en tasas de más del 96% en áreas en el centro y sur de América (Weller et al. 1978; Tabla 1).

### *Flebótomos*

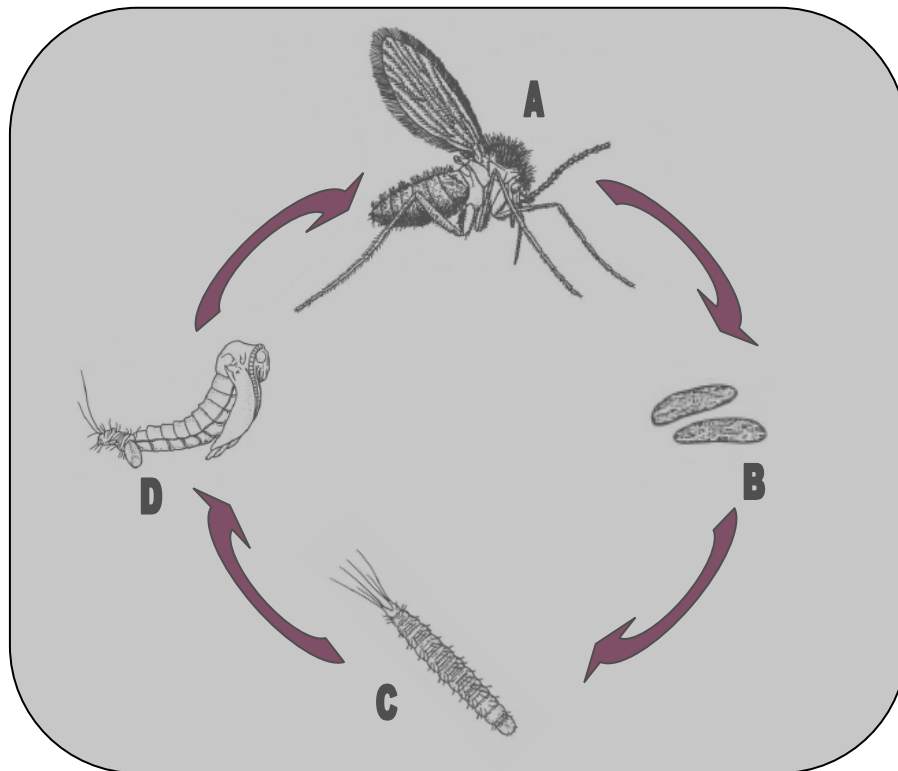
Los flebótomos son vectores hematófagos cuya importancia epidemiológica en salud pública radica principalmente en la transmisión de diversos virus del género *Phlebovirus*, de agentes bacterianos y de agentes parasitarios como *Leishmania* spp. que afectan tanto a humanos como a animales domésticos y silvestres (Munstermann 2005; Figura 2). Debido a que numerosas especies de flebótomos no tienen repercusión sanitaria, en este trabajo de Tesis Doctoral se aportará información principalmente sobre las especies relevantes desde el punto de vista de salud pública y sanidad animal.

#### 1. Clasificación taxonómica, biología y ecología de los flebótomos

Los flebotominos son dípteros que pertenecen a la familia *Psychodidae*; subfamilia *Phlebotominae*. Los flebotominos se dividen en dos géneros principales, *Phlebotomus* o flebótomos, con 12 subgéneros en el viejo mundo, y *Lutzomya*, con 25 subgéneros en el nuevo mundo. Actualmente sigue siendo escaso el conocimiento de la biología de estos organismos, incluso se menciona que solamente se conoce el ciclo de vida completo del 5% de las especies conocidas (Munstermann 2005).

El tamaño de los adultos es aproximadamente de 2,5 mm. Los flebótomos desarrollan una metamorfosis completa desde una fase de huevo, pasando por cuatro estadios de larva y uno de pupa hasta llegar a la forma adulta, completándose el ciclo en al menos 6 semanas en condiciones favorables (Killick-Kendrick 1999; Figura 5). Para

la oviposición las hembras eligen lugares con alta carga de materia orgánica y elevada humedad relativa, aunque algunas especies de flebótomos están asociados a olivares en regiones semi-áridas de la cuenca mediterránea occidental y de Oriente Próximo (Rioux et al 1997). La temperatura, como en otros dípteros, acelera el desarrollo del ciclo de vida. Tesh y Guzman (1996) describieron que algunas especies de flebótomos en un ambiente con altas temperaturas pueden completar su desarrollo larvario en un mes. Sin embargo, a bajas temperaturas el desarrollo larvario puede prolongarse hasta más de 3 meses. Como en el caso de otros insectos hematófagos, los flebótomos presentan dos glándulas salivares saculares localizadas en el tórax que vierten su secreción a través de conductos salivares en el momento de la picadura al huésped, facilitando la transmisión de un posible patógeno contenido en dichas glándulas (García-Almagro 2004). Habitualmente los flebótomos se alimentan de savia vegetal o de jugos segregados por pulgones, pero las hembras necesitan alimentarse de sangre de hospedadores vertebrados para llevar a cabo la maduración de los huevos (Killick-Kendrick 1999). Los flebótomos son insectos de actividad crepuscular con desplazamientos cortos, aunque algunas especies presentan actividad diurna principalmente (Killick-Kendrick 1987). Son preferentemente exofágicas, es decir, se alimentan en ambientes abiertos, aunque se conocen especies endófagicas que se alimentan en el interior de viviendas, establos o cubículos cerrados donde hay presencia de hospedadores, como es el caso de *Ph. papatasi*. Por otra parte, la mayor parte de flebótomos son fototrópicos, penetrando en las viviendas cuando estas están iluminadas (García-Almagro 2004). Las especies de flebótomos más abundantes en el Mediterráneo son *Sergentomyia minuta*, *Ph. papatasi*, *Ph. sergenti*, *Ph. perniciosus* y *Ph. ariasi*. Éstas dos últimas especies presentan un incremento en su distribución hacia el norte del continente europeo en los últimos años (Kuhn 1999).



**Figura 5.** Etapas del ciclo biológico general de los flebótomos: A) adulto; B) huevo; C) larva con 4 estados; y D) pupa. Adaptado de Munstermann (2005).

En el ámbito de preferencias alimenticias, las hembras de flebótomos en general no son consideradas fuertemente antropófilas. En general los flebótomos se alimentan del hospedador más disponible incluyendo desde aves de corral a diversos mamíferos, por lo tanto se les considera oportunistas (Rossi et al. 2008).

## 2. Patógenos transmitidos por flebótomos

Virus del género *Phlebovirus* como el virus Toscana, el virus Nápoles y el virus Sicilia son endémicos en la cuenca mediterránea y amenazan con extenderse a zonas más templadas de Europa donde los vectores son abundantes. Las fiebres de Sicilia y de Nápoles, a pesar de tratarse de enfermedades etiológicamente diferentes, son conocidas en conjunto como "la fiebre de los tres días" (Depaquit et al. 2010). Este grupo de virus

afecta principalmente al ser humano, presentando síntomas gripales que incluyen fiebre, mialgias y malestar general (Depaquit et al. 2010). Por otro lado, el virus de Toscana ocasiona brotes de meningoencefalitis aguda en países europeos que bordean el mar Mediterráneo como Italia, Francia, Portugal y España (Valassina et al. 2000; Charrel et al. 2005; Sanbonmatsu-Gámez et al. 2005; Santos et al. 2007). La seroprevalencia del virus Toscana registrada en pacientes humanos en España oscila entre el 5 y el 22%, constituyendo una de las más altas en la cuenca mediterránea (Mendoza-Montero et al. 1998; Echevarria et al. 2003). Charrel et al. (2009) aisló recientemente en Francia un nuevo flebovirus al que llamaron virus de Massilia, del que hasta ahora se desconoce la importancia clínica. Por otro lado existen otros virus transmitidos por flebótomos que causan enfermedades en seres humanos como el virus de Chandipura, endémico en la India (Mavale et al. 2007), el virus de Isfahan aislado en Irán (Tesh et al. 1977) o el virus de Jug Bogdanovac aislado en Serbia (Gligic et al. 1982). Es necesario mencionar que aunque actualmente estos últimos virus no son de relevancia sanitaria en territorio europeo, deben ser considerados como posibles agentes patógenos emergentes transmitidos por flebótomos.

Algunas especies de flebótomos ha sido descritos como vectores de *Bartonella bacilliformis*, el agente causal de bartonelosis en humanos y animales (Depaquit et al. 2010). Sin embargo el papel más relevante de los flebótomos en Europa es sin duda debido a su capacidad de actuar como vectores de los agentes causales de leishmaniasis. La leishmaniasis es una zoonosis que afecta a 12 millones de personas en todo el mundo (Díaz et al. 2012). Existen más de 20 especies de protozoos clasificados en el género *Leishmania* que pueden causar leishmaniasis en humanos y animales tanto domésticos como silvestres. La leishmaniasis puede presentarse de forma cutánea, mucocutánea y visceral. En Europa, tanto la leishmaniasis cutánea como visceral en humanos es

endémica en casi toda la cuenca mediterránea, donde el agente etiológico es *L. infantum*, transmitido por *Ph perniciosus* y *Ph ariasi* (Gramiccia y Gradoni 2005; Kampen y Werner 2011). La forma mucocutánea de la leishmaniasis es ocasionada por *L. tropica*, un agente del que de momento en Europa sólo se han descrito casos esporádicos en Grecia (Kampen y Werner 2011). Además, recientemente Léger et al. (2008) informaron de la introducción de *L. donovani* a Chipre, pudiendo constituir un punto inicial de expansión de este patógeno al resto de Europa (Depaquit et al. 2010; Tabla 1). Por su parte, Ready (2010) menciona que la leishmaniasis tiene un elevado riesgo de extenderse a regiones más septentrionales de Europa debido a múltiples factores desencadenantes, entre los que destaca la dispersión de los vectores y el cambio climático. La leishmaniasis es una enfermedad de gran relevancia en enfermos inmunodeprimidos; en el sur de Europa se describen 1500 casos de leishmaniasis al año en enfermos de SIDA, representando el 90% del total de casos conocidos en el mundo. Casi el 60% de los casos europeos corresponden a España (Alvar 1999). Recientemente se han registrado brotes importantes en Madrid que se han vinculado a la posible proliferación de liebre ibérica (*Lepus granatensis*; Molina et al. 2012). La fauna silvestre juega un papel importante en la epidemiología de la leishmaniasis (Sobrino et al. 2008), que en la actualidad es poco conocido.

#### *Vigilancia de dípteros vectores de enfermedades*

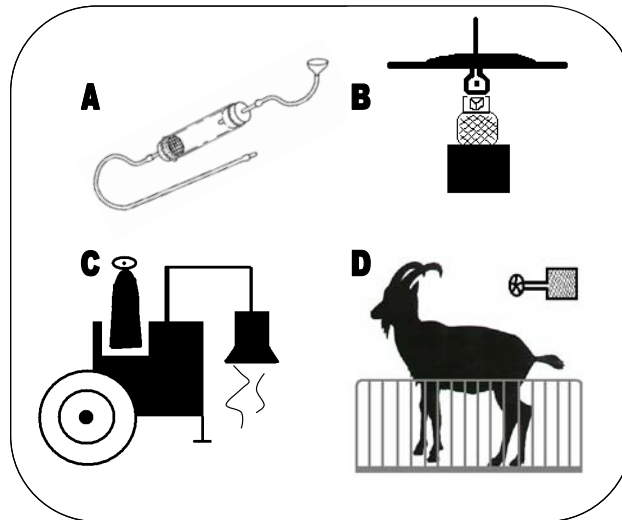
En el estudio de las ETVs un factor básico es la vigilancia y monitorización de los vectores. De acuerdo con la OMS la vigilancia entomológica sirve, entre otras cosas, para determinar cambios en la distribución geográfica y la densidad de un vector, evaluar programas de control, obtener un parámetro de la densidad poblacional en el tiempo y facilitar decisiones ante una intervención determinada, identificando áreas con

elevado potencial para albergar poblaciones importantes de vectores. Numerosos métodos de monitorización han sido desarrollados a lo largo de la investigación entomológica, pero la selección de la técnica del muestreo adecuada depende principalmente de los objetivos del programa de vigilancia (Braks et al. 2011).

La monitorización de vectores del orden Diptera se lleva a cabo principalmente con la recolección de individuos en estados larvario y adulto (Becker et al. 2010). Las hembras de dípteros basan la búsqueda de hospedadores potenciales en estímulos atractivos. Esta atracción puede ser por tres tipos de estímulos: olfativo, luminoso o térmico. La simulación del estímulo de atracción olfativo consiste en estimular a la hembra a través de un cebo de olor, ya sea ácido láctico y/o sudor humano o animal, o bien utilizando CO<sub>2</sub> que es el resultado de la espiración de los hospedadores (Gage y Moore 2004). La atracción luminosa es generada por la luz y por el movimiento de las sombras que se genera, para lo cual se utilizan fuentes de luz artificial como atractivos. La atracción térmica está causada por el calor del cuerpo de los hospedadores (Takken 1991; Petric et al. 1995; Becker et al. 2010).

Actualmente existe una gran variedad de técnicas y herramientas de muestreo para la recolección de estos organismos. Para la captura de individuos adultos de culícidos, *Culicoides* y flebótomos la herramienta más comúnmente utilizada es la trampa tipo “Centers for Disease Control” (CDC) descrita por Sudia y Chamberlain (1962), utilizada con un atractivo, ya sea luz, CO<sub>2</sub>, o ambos (Rowley y Jorgense 1967; Wieserschimpf et al. 1990; Ritchie y Kline 1995; Petric et al. 1999; Alexander y Maroli 2003; Eldridge 2005; Venter y Hermanides 2006; Figura 6). También existen métodos más específicos como los aspiradores de succión (Figura 6) o las trampas BG sentinel diseñadas para *Aedes* spp. (Ball y Ritchie 2010). Recientemente se ha puesto a la venta el sistema de *Mosquito-Magnet*<sup>®</sup>; que utiliza propano en gas como atractivo (Figura 6).

Con este gran abanico de opciones se puede elegir el mejor método de captura acorde con los objetivos del estudio planteado. Esto se debe hacer de acuerdo a factores como la región, las condiciones meteorológicas en el sitio de estudio, el patrón de actividad de la especie o especies diana y las etapas fisiológicas de las especies a coleccionar, por mencionar algunos de los factores a considerar (Plata 2008).



**Figura 6.** Métodos de captura general de dípteros adultos: A) aspirador de succión (Figura procedente de Becker et al. (2010)); B) CDC; C) *Mosquito-Magnet*<sup>®</sup>; y D) trampa con cebo animal vivo. Figura adaptada de Becker et al. (2010).

Por otra parte, debido a que la presencia de agentes patógenos transmitidos por vectores en los hospedadores vertebrados puede ser de corta duración, como por ejemplo los arbovirus, la detección de patógenos en los vectores es a menudo un método de elección para monitorizar una enfermedad determinada (Braks et al. 2011). Es por ello que la monitorización de los riesgos de adquirir una infección tras la picadura de un vector a los que los hospedadores están expuestos se mide a través de la prevalencia del patógeno en los vectores y de la tasa de exposición de los hospedadores a las picaduras de los mismos. Así, la captura de ejemplares adultos es recomendable para estudios

epidemiológicos, ya que los estadios larvarios no han tenido contacto con los hospedadores.

*Riesgos sanitarios asociados a las enfermedades transmitidas por vectores en Europa y España*

En Europa, y más específicamente en España, concurren numerosos factores que pueden incrementar no sólo el riesgo de introducción de nuevas ETVs, sino también el riesgo de expansión y las tasas de circulación de las ETVs endémicas. Dentro de estos numerosos factores podemos destacar: i) la proximidad geográfica de la Unión Europea a zonas tropicales y subtropicales endémicas de numerosos patógenos transmitidos por vectores; ii) el elevado intercambio comercial con países de numerosas regiones del mundo que incrementa los riesgos de introducción de vectores potencialmente adaptables a hábitats europeos – como es el caso de *Ae. albopictus* – y de los patógenos que portan; iii) la presencia de numerosas rutas migratorias de aves procedentes de regiones tropicales y subtropicales; iv) la elevada carga migratoria de personas procedentes del continente africano; y v) el elevado peso comercial de las importaciones a la Unión Europea desde terceros países, tanto de regiones tropicales como de regiones templadas. Un factor común a numerosas regiones del mundo, pero sobre todo a regiones templadas del planeta es el cambio climático y la consecuente alteración en los ecosistemas y en la favorabilidad ambiental para vectores artrópodos y sus patógenos, y que sin duda es uno de los factores con mayor peso en el riesgo al que Europa está expuesta. En Europa se prevén cambios en la temperatura media anual y la precipitación media, con inviernos más cálidos en el norte y veranos más cálidos en el sur (Giorgi et al. 2004). El efecto del aumento de las temperaturas en Europa puede tener dos consecuencias importantes sobre los vectores artrópodos: a) acortar la duración del



periodo de desarrollo de los artrópodos; y b) modificar la distribución y abundancia de los mismos, mejorando la favorabilidad de territorios anteriormente no favorables o incrementándola/disminuyéndola en territorios donde estaban presentes. Además, estos cambios en el clima pueden conllevar paralelamente variaciones en los periodos de incubación de los patógenos transmitidos, que puede conducir al aumento de riesgo de contacto de animales y personas con patógenos causantes de ETVs (Semenza y Menne 2009). Las principales expectativas de los expertos mundiales son que a medida que el clima se haga más cálido, los vectores ampliarán probablemente su distribución en Europa y es posible que entren nuevas especies de vectores procedentes de los trópicos (Githeko et al. 2001). Sin embargo, no en todos los casos el cambio climático parece tender a incrementar la distribución de los vectores, aunque sí repercutir en la dinámica poblacional de los mismos (ver predicciones para *C. imicola* en Acevedo et al. 2010).

El riesgo de exposición a ETVs está ligado a factores como el incremento en el transporte de personas, animales y mercancías o la cada vez mayor tasa de migración humana por factores socioeconómicos (Kampen y Werner 2011). *Ae. albopictus* es uno de los claros ejemplos del riesgo de adaptación de vectores de enfermedades tropicales en zonas templadas debido a introducciones accidentales ocasionadas por el comercio internacional (Flacio et al. 2004). En la actualidad existen varias poblaciones de *Ae. albopictus* establecidas en Europa a partir de la introducción de ejemplares a países de la costa del Adriático (Dalla Pozza y Majori 1992; Delacour et al. 2009). Las poblaciones de esta especie de vector parecen estar experimentando un incremento en su distribución geográfica dentro de las penínsulas ibérica e itálica (Romi 2001; Rueda y Hernández 2008) que pueden indicar la clara favorabilidad ambiental de la cuenca mediterránea para esta especie. Sin embargo, estudios recientes de favorabilidad climática para *Ae. albopictus* en Europa señalan un probable descenso de favorabilidad

en el sur de Europa frente a un claro incremento de la misma en el centro y norte del continente (Caminade et al. 2012).

En verano del 2007 se describió por vez primera en Europa un brote de fiebre de Chikungunya vinculado a turistas italianos que habían viajado a la India en ese mismo año (Rezza et al. 2007), mostrando con ello el riesgo de introducción de patógenos exóticos a través del transporte. En Europa existen multitud de ejemplos de ETV introducidas a través del turismo – caso del dengue (Schmidt-Chanasit et al. 2010)– o el caso del virus de Usutu (originario de África) en mirlos (*Turdus merula*) en Austria y que posteriormente se ha extendido a varios países europeos (Weissenböck et al. 2002; Busquets et al. 2008). Un ejemplo más cercano es el de la potencial re-emergencia de *P. vivax* en España. España sufrió una serie de brotes de malaria a mediados del s. XX (López-Vélez et al. 1999), que posteriormente, y a consecuencia de la intensiva lucha antipalúdica de las autoridades sanitarias, fue erradicada. Sin embargo, recientemente se describió un brote aislado de malaria autóctona en el centro norte de la comunidad de Aragón (Peralta et al. 2010). Esta evidencia junto con los numerosos casos descritos de importación a través de aeropuertos (Peralta et al. 2010) pone de manifiesto el enorme riesgo para España y la Unión Europea donde existen poblaciones estables de vectores competentes – *Anopheles* spp. – de *P. vivax* (Bueno-Marí y Jiménez-Peydró 2008). A pesar de todo, con respecto a la malaria, Githenko et al. (2001) augura que, de presentarse en Europa occidental, es posible que únicamente establezca circulación en pequeños focos circunscritos a un número reducido de personas y de carácter esporádico, como ha sucedido hasta ahora.

Por otro lado, las ETVs endémicas también pueden ver alterada su dinámica, extendiendo su radio de acción o las tasas de circulación, consecuentemente incrementando el riesgo de exposición de la población y de la fauna a los patógenos

causales. Un ejemplo reciente es el del brote de leishmaniasis visceral y cutánea que desde la primavera de 2011 está afectando a numerosas personas de municipios del sur del área metropolitana madrileña (Promed 2012). Así mismo, *L. infantum* parece estar incrementando su distribución hacia el norte de la península ibérica (Sobrino et al. 2008), probablemente debido a que tanto las condiciones para los vectores como para la replicación del patógeno están mejorando en esas latitudes.

Es así la Unión Europea, y España en concreto por su localización geográfica dentro de la misma, un territorio bajo un enorme riesgo de emergencia, re-emergencia y alteración de ETVs exóticas y endémicas, respectivamente. La vigilancia entomológica y epidemiológica enfocada a comprender cual va a ser la dinámica futura de estos patógenos puede contribuir a prevenir desastres humanos, naturales y económicos derivados de las ETVs.

#### *Importancia del conocimiento de vectores a nivel regional: Castilla-La Mancha*

En Castilla – La Mancha existen diferentes ecosistemas de gran importancia ecológica, entre los cuales cabe resaltar la relevancia de los humedales, ya que constituyen uno de los ecosistemas más complejos y productivos del planeta por su riqueza y diversidad de componentes bióticos y abióticos (Ramsar 2004). Dentro de Europa es posible que España sea uno de los países con más lugares registrados en la lista Ramsar de humedales de importancia internacional (223022 Ha). Andalucía encabeza la lista con 25 lugares y en segundo lugar encontramos a Castilla – La Mancha con 7 lugares: el Parque Nacional de las Tablas de Daimiel, la Laguna de la Vega, las lagunas de Alcázar de San Juan, la Laguna del Prado, la Laguna de El Hito, la Laguna de Manjavacas y la Laguna de La Puebla de Beleña. La presencia relativamente estable de agua en las zonas húmedas resulta favorable para las condiciones ambientales requeridas por numerosos

vectores, principalmente los mosquitos, porque además de ofrecer la presencia de agua, también ofrecen alimento para estos vectores por la elevada abundancia y diversidad de especies de aves (Bueno-Marí et al. 2010). Además, los humedales en España son destacados ecosistemas receptores de aves migratorias procedentes de África y del norte de Europa (Jourdain et al. 2007). Se conoce que las aves migratorias tienen un papel fundamental en la diseminación de patógenos a lugares distantes, y de esta manera se facilita el contacto de los agentes patógenos tanto con la población humana como con los animales ya sean domésticos o silvestres (Rappole et al. 2000; McLean et al. 2002). Este escenario favorable para vectores y patógenos representa un riesgo importante de introducción de ETVs exóticas que puedan vehicular las aves. Algunos trabajos sugieren que muchas de las especies de aves migratorias en Eurasia desarrollan una viremia de virus WN suficiente como para infectar al mosquito vector. Así mismo, señalan que el estrés debido a la migración causa en ellas una inmunosupresión que hace que aumente la replicación viral (Rappole et al. 2000) y por lo tanto las señala como un factor muy relevante en la introducción de este vector a zonas húmedas. Un hecho que podría apoyar esta teoría es el que los brotes del virus WN en regiones templadas ocurren generalmente a finales del verano o principios del otoño, coincidiendo con la llegada de grandes concentraciones de aves migratorias y con la época de mayor actividad de los mosquitos. López et al. (2008) observaron en Sevilla que de diferentes especies de aves capturadas, las especies migratorias presentaron mayores títulos de anticuerpos neutralizantes del virus WN en comparación con las aves residentes.

Otro factor que puede contribuir significativamente a la dinámica poblacional de los dípteros hematófagos es la dinámica poblacional de las especies de fauna silvestre que puedan actuar como hospedadores. En los últimos años las poblaciones de algunas

especies de fauna silvestre en España se han expandido en tamaño y distribución, como las poblaciones de ciervo rojo y de jabalí europeo (Gortázar et al. 2000; Acevedo et al. 2005). Las causas del aumento de la densidad de las poblaciones de hospedadores silvestres son numerosas, entre las que cabe mencionar la migración de los campesinos del campo a la ciudad, el consecuente abandono de tierras de cultivo y del pastoreo o los cambios en los sistemas de gestión de las especies cinegéticas, entre otras (Gortázar et al. 2000; Acevedo et al. 2006; Hartley y Gill 2010). En España, la caza tiene una gran relevancia económica, sobre todo en las economías rurales, pues genera 240 millones de euros al año (JCCM 2012). Tan sólo en Castilla – La Mancha se estima que se destinan 7 millones de hectáreas a esta actividad (JCCM 2012). La gestión de la industria de la caza es en Castilla – La Mancha uno de los factores que ha favorecido el aumento de la densidad de las poblaciones de animales cinegéticos hasta alcanzar situaciones de clara sobreabundancia (Gortázar et al. 2006). La intensificación de esta industria acarrea traslocaciones de animales, como la suelta masiva de perdices rojas (*Alectoris rufa*) de granja o los movimientos en ungulados cinegéticos, con fines de incrementar tanto la disponibilidad de piezas de caza como para introducir variabilidad genética o reforzar poblaciones autóctonas. Además, es frecuente la introducción de alimentación suplementaria para las especies cinegéticas, aumentando con ello la capacidad de carga del medio y repercutiendo significativamente sobre la dinámica de las enfermedades que portan estas especies (Vicente et al. 2007). La situación de Castilla – La Mancha, en la que la gestión cinegética intensiva es frecuente, compromete en gran medida la dinámica de las poblaciones de vectores y, con ello, la epidemiología de los patógenos que transmiten.

Para finalizar con esta introducción se debe mencionar que en Castilla – La Mancha el conocimiento de vectores de importancia en salud pública y veterinaria es

todavía muy limitado. Por ello, existe la necesidad de realizar estudios de campo para anticipar la aparición de patógenos que ocasionen posibles brotes de ETVs que afecten a los seres humanos y animales.

## Bibliografía

- Acevedo P, et al. (2005) Environmental constraints in the colonization sequence of roe deer (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758) across the Iberian Mountains, Spain. *Journal of Biogeography* 32: 1671–1680
- Acevedo P, Escudero MA, Muñoz R, Gortázar C (2006) Factors affecting wild boar abundance across an environmental gradient in Spain. *Acta Theriologica* 51: 327–336
- Acevedo P, et al. (2010) A Broad Assessment of Factors Determining *Culicoides imicola* Abundance: Modelling the Present and Forecasting Its Future in Climate Change Scenarios. *Plos one* 5(12)
- Alexander B, Maroli M (2003) Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology* 17(1):1-18
- Alto BW, Mutur EJ, Ampan L (2012) Effects of nutrition and density in *Culex pipiens* *Medical and Veterinary Entomology*
- Alvar J (1999) Leishmania and AIDS coinfection in mediterranean region. In canine leishmaniasis. An update Killick-Kendrick ed. *Proceedings of canine leishmaniasis forum, Barcelona* 78-81
- Agüero M, et al.(2011) Bagaza Virus in Partridges and Pheasants, Spain, 2010. *Bagaza Virus in Partridges and Pheasants, Spain, 2010. Emerging Infectious Disease* 17:1498–501
- Apperson CS, et al. (2004) Host feeding patterns of established and potential mosquito vectors of West Nile virus in the eastern United States. *Vector-Borne Zoonotic Disease* 4:71–82
- Azzam AM (2012) Mosquito fauna (Diptera: *Culicidae*) of the Eastern Region of Saudi Arabia and their seasonal abundance. *Journal of King Saud University* 24: 55-62
- Ball TS, Ritchie S (2010) Sampling biases of the Bg-sentinel trap with respect to physiology, age, and body size of adult *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). *Journal of Medical Entomology* 47(4):649-656
- Bardos V, Danielova VJ (1959) The Tahyna virus--a virus isolated from mosquitoes in Czechoslovakia. *Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 3:264-76
- Bartsch S, Bauer B, Wiemann A, Clausen PH, Steuber S (2009) Feeding patterns of biting midges of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* groups on selected farms in Brandenburg, Germany. *Parasitology Research* 105: 373-380
- Becker N (2008) Influence of climate change on mosquito development and mosquito-borne diseases in Europe. *Parasitology Research* 103:19-28
- Becker N, et al. (2010) *Mosquitoes and their control*, 2 nd edn. Springer, Heidelberg
- Bernabeu-Wittel M, et al. (2007) West Nile virus past infections in the general population of Southern Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 25(9):561-565

- Beeuwkes J, Den Hartog W, Dik M, Scholte E (2011) Surveillance and findings of exotic mosquitoes in used tires in the Netherlands; a methodological approach. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting* 22: 31-37
- Bhasin A, Mordue AJ, Mordue W (2000) Electrophysiological and behavioural identification of host kairomones as olfactory cues for *Culicoides impunctatus* and *Culicoides nubeculosus* *Physiology and Entomology* 25: 6–16
- Bidlingmayer WL (1974) The influence of environmental factors and physiological stage on flight patterns of mosquitoes taken in the vehicle aspirator and truck, suction, bait and New Jersey light traps. *Journal of Medical Entomology* 11:119-146
- Boadella M, Díez-Delgado I, Gutiérrez A, Höfle U, Gortázar C (2012) Do Wild Ungulates Allow Improved Monitoring of Flavivirus Circulation in Spain? *Vector-Borne and Zoonotic Diseases In press*
- Bofill D (2006) Human West Nile virus infection, Catalonia, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 12:1307-1307
- Borkent A (2005) The biting midges, the Ceratopogonidae (Diptera). In: Marquardt WC (ed) *Biology of Disease Vectors* Elsevier Science and Technology, London 113-126
- Braks M, et al. (2011) Towards an integrated approach in surveillance of vector-borne diseases in Europe. *Parasites and Vectors* 4:192
- Bram RA, George JE, Reichard RE, Tabachnick WJ (2002) Threat of foreign arthropod-borne pathogens to livestock in the United States. *Journal of Medical Entomology* 39(3):405-416
- Bueno-Marí R, Chordá Olmos FA, Barnués-Bañeres A, Jiménez-Peydró R (2010) Detección de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) en Torrevieja (Alicante, España). *Boletín de la Asociación española de Entomología* 33:529-532
- Bueno-Marí R, Jiménez-Peydró (2008) Malaria en España: aspectos entomológicos y perspectivas de futuro. *Revista Española de Salud Pública* 82:467-489
- Bueno Marí R, Jiménez Peydró R. (2011) Classification of Spanish Mosquitoes in Functional Groups. *Journal of American Mosquitoes Control Association* 27: 1-7
- Busquets N, Alba A, Allepuz A, Aranda C, Nunez JI (2008) Usutu virus sequences in *Culex pipiens* (Diptera: *Culicidae*), Spain. *Emerging Infectious Diseases* 14(5):861-863
- Calistri P, et al. (2010) Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean basin. *Open Virology Journal* 22: 29 – 37
- Caminade C, et al. (2012) Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: recent trends and future scenarios. *Journal of the Royal Society Interface* Publicacion online
- Cancrini G, Scaramozzino P, Gabrielli S, Di Paolo M, Toma L, Romi R (2007) *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* implicated as natural vectors of *Dirofilaria repens* in central Italy. *Journal of Medical Entomology* 44(6):1064-1066
- Carpenter S, Szmaragd C, Barber J, Labuschagne K, Gubbins S, Mellor P (2008) An assessment of *Culicoides* surveillance techniques in northern Europe: have we underestimated a potential bluetongue virus vector? *Journal of Applied Ecology* 45(4):1237-1245
- Charrel RN, et al. (2005) Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 11(11):1657-1663

- Charrel RN, et al. (2009) Massilia virus, a novel Phlebovirus (*Bunyaviridae*) Isolated from Sandflies in the Mediterranean. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 9(5):519-530
- Chevalier V, Pepin M, Plee L, Lancelot R (2010) Rift Valley fever - a threat for Europe? *Eurosurveillance* 15(10):18-28
- Christenson B (1984) An outbreak of tularemia in the northern part of central Sweden. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 16(3):285-290
- Chivian E (2002) Biodiversity: its Importance to Human Health. Center for Health and the Global Environment, Harvard
- Clavero G (1946) Aedinos de España. *Revista de Sanidad e Higiene Pública* 20 (2): 1206-1232
- Clements AN (1992) *The Biology of Mosquitoes*. Chapman and Hall, London
- Cohen J, Powderly WG (2004) *Infectious Diseases*. 2nd ed. Elsevier Limited, Edinburgh
- Coetzer JAW, Tustin RC (2004) *Infectious Diseases of Livestock Southern Africa*, 2 edn. Oxford University Press, Cape Town
- Daszak P, Cunningham A, Hyatt A (2000) Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science* 287:443-449
- De la Fuente J, et al. (2004) Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari : *Ixodidae*) collected from European wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. *European Journal of Wildlife Research* 50(4):187-196
- Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE, Peyrefitte C (2010) Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Eurosurveillance* 15(10):40-47
- Dalla Pozza G, Majori G (1992) First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *Journal of the American Mosquito Control Association* 8(3):318-320
- Delacour S, et al. (2009) *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) primera cita en Torrevieja (Alicante). *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa* 45:518
- Díaz SJ, Barrientos SS; Morell MS (2012) Leishmaniasis cutánea. *Formación Médica Continuada de Atención Primaria* 19:117-128
- Dohm DJ, Logan TM, Barth JF, Turell MJ (1995) Laboratory transmission of Sindbis-virus by *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* (Diptera: *Culicidae*). *Journal of Medical Entomology* 32(6):818-821
- Dubay SA, Noon TH, deVos ND, Ockenfels RA (2006) Serologic Survey for Pathogens Potentially Affecting Pronghorn (*Antilocapra Americana*) Fawn Recruitment in Arizona, USA. *Journal of Wildlife Disease* 42: 844-848
- Echevarria JM, et al. (2003) Acute meningitis due to Toscana virus infection among patients from both the Spanish Mediterranean region and the region of Madrid. *Journal of Clinical Virology* 26(1):79-84
- EFSA (2012) European food service authority. <http://www.efesa.eu>
- Eldridge BF (2005) Mosquitoes, the Culicidae. In: Marquardt WC (ed) *Biology of Disease Vectors*. Elsevier Science and Technology, London 95-110
- Eliasson H, Lindback J, Nuorti JP, Arneborn M, Giesecke J, Tegnell A (2002) The 2000 tularemia outbreak: A case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden. *Emerging Infectious Diseases* 8(9):956-960
- Estrada-Peña A, Jongejan F (1999) Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Experimental and Applied Acarology* 23(9):685-715



- Falconi C, Ramon Lopez-Olvera J, Gortazar C (2011) BTV infection in wild ruminants, with emphasis on red deer: A review. *Veterinary Microbiology* 151(3-4):209-219
- Flacio E, Lüthy P, Patocchi N, Guidotti F, Tonolla M, Peduzzi R. (2004) Primo ritrovamento di *Aedes albopictus* in Svizzera. *STSN* 92: 141-142
- Gail AS, Belton P, Kleider N (1988) The hypersensitivity of horses to *Culicoides* bites in British Columbia. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne* 29(9):718-723
- Gale P, Drew T, Phipps LP, David G, Wooldridge M (2009) The effect of climate change on the occurrence and prevalence of livestock diseases in Great Britain: a review. *Journal of Applied Microbiology* 106(5):1409-1423
- Gamino V, Gutierrez-Guzman AV, Martínez MD, Höefle U (2012) Pathological findings in red-legged partridges (*Alectoris rufa*) and common pheasants (*Phasianus colchicus*) naturally infected with Bagaza virus (Bagv) in Spain. *Journal of Comparative Pathology*. 146(1):71-71
- García-Almagro D (2004) Leishmaniasis cutánea: Estudio en el área de sanitaria de Toledo. Universidad Complutense de Madrid
- Gibbs EP, Lawman MJP (1977) Infection of British deer and farm animals with epizootic hemorrhagic disease of deer virus. *Journal of Comparative Pathology* 87:335
- Giorgi F, Bi XQ, Pal J (2004) Mean, interannual variability and trends in a regional climate change experiment over Europe. II: climate change scenarios. *Climate Dynamics* 23(7-8):839-858
- Githeko A, Lindsay S, Confalonieri U, Patz J (2001) El cambio climático y las enfermedades transmitidas por vectores: un análisis regional. *Salud y medio ambiente. Boletín de la Organización Mundial de la Salud* 4:72-82
- Glick JI (1990) *Culicoides* Biting midges (Diptera: *Ceratopogonidae*) of Kenya. *Journal of Medical Entomology* 27(2):85-195
- Gligic A, Miscevic Z, Tesh RB, Travassos da Rosa A, Zivkovic V (1982) First isolation of Naples sandfly fever in Yugoslavia. *Acta Biol Jug Mikrobiol* 19:167-175
- Gortazar C, Herrero J, Villafuerte R, Marco J (2000) Historical examination of the status of large mammals in Aragon, Spain. *Mammalia* 64: 411-422
- Gortazar C, Acevedo P, Ruiz-Fons F, Vicente J (2006) Disease risks and overabundance of game species. *European Journal of Wildlife Research* 52: 81-87
- Gould EA, Solomon T (2008) Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 371:500-9
- Gould EA, Gallian P, de Lamballerie X, Charrel RN (2010) First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality *Clinical Microbiology and Infection* 16(12):1702-1704
- Gramiccia M, Gradoni L (2005) The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology* 35(11-12):1169-1180
- Gratz NG (1999) Emerging and resurging vector-borne diseases. *Ann Rev Ent* 44:51-75
- Gubler G (1998) Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews* 11 480-496
- Guis H, Caminade C, Calvete C, Morse AP, Tran A, Baylis M (2012) Modelling the effects of past and future climate on the risk of bluetongue emergence in Europe. *Journal of the Royal Society Interface* 9(67):339-350
- Gullan PJ, Cranston PS (2005) *The Insects. An Outline of Entomology*. Blackwell Publishing, Oxford

- Gutiérrez-Guzmán AV, Vicente J, Sobrino R, Perez-Ramírez E, Llorente F, Höfle U (2012) Antibodies to West Nile virus and related flaviviruses in wild boar, red foxes and other mesomammals from Spain *Veterinary Microbiology In press*
- Harrus S, Baneth G (2005) Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. *International Journal Parasitology* 35:1309–1318
- Hartley M, Gill E (2010) Assessment and mitigation processes for disease risks associated with wildlife management and conservation interventions. *The Veterinary Record* 166: 487–490
- Hendrickx G, et al. (2008) A wind density model to quantify the airborne spread of species during North-Western Europe bluetongue epidemic, 2006. *Preventive Veterinary Medicine* 87(1-2):162-181
- Higgs S, Snowb K, Gould EA (2004) The potential for West Nile virus to establish outside of its natural range: a consideration of potential mosquito vectors in the United Kingdom. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98:82-87
- Höfle U, et al. (2008) West Nile virus in the endangered Spanish imperial eagle. *Veterinary Microbiology* 129(1-2):171-178
- Issa NL, Heather MF (2009) Trends and parasitology. Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors 25:189-196
- JCCLM (2011) Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. La caza en Castilla-La Mancha. [www.jcclm.es](http://www.jcclm.es)
- Jennings M, Mellor PS (1989) *Culicoides* -Biological vectors of Akabane virus. *Veterinary Microbiology* 21(2):125-131
- Jimenez-Clavero MA, et al. (2008) West Nile virus in golden eagles, Spain, 2007. *Emerging Infectious Diseases* 14(9):1489-1491
- Jones KE, et al. (2008) Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990-993
- Jourdain E, Gauthier-Clerc M, Bicout DJ, Sabatier P (2007) Bird migration routes and risk for pathogen dispersion into western Mediterranean wetlands. *Emerging Infectious Diseases* 13(3):365-372
- Kampen H, Werner D (2011) Arthropod vectors and their growing importance in Europe. In: Mehlhorn (ed) *Book series: advances in parasitology research*. vol 2. Springer, New York
- Killick-Kendrick R (1987) The microecology of *Leishmania* in the gut and proboscis of the sandfly. *NATO ASI Series Series H Cell Biology* 11:397-406
- Killick-Kendrick R (1999) The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology* 17(3):279-289
- Kilpatrick AM, Kramer LD, Campbell SR, Alleyne EO, Dobson AP, Daszak P (2005) West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm. *Emerging Infectious Diseases* 11(3):425-429
- Kilpatrick AM, Kramer LD, Jones MJ, Marra PP, Daszak P, Fonseca DM (2007) Genetic influences on mosquito feeding behavior and the emergence of zoonotic pathogens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77: 667-671
- Kirkeby C, Bødker R, Stockmarr A, Enøe C, (2009) Association between land cover and *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*) breeding sites on four Danish cattlefarms. *Journal Entomologica Fennica* 20 (4):228-232
- Kuhn GK (1999) Global warming and leishmaniasis in Italy. *Bulletin Tropical Medicine and International Health* 7:1-2

- LaDeau SL, Marra PP, Kilpatrick AM, Calder CA (2008) West Nile Virus Revisited: Consequences for North American Ecology. *Bioscience* 58(10):937-946
- Lanciotti RS, et al. (1999) Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Journal of Science* 286: 2333-2337
- Louria DB (2007) Undernutrition can affect the invading microorganism. *Clinical Infectious Disease* 45:470-474
- Lederberg RE, Shope SC, Oakes J (1992) *Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States*. National Academy Press, Washington DC
- Leger N, Depaquit J (2008) *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. *Lancet Infectious Diseases* 8(7):402-402
- Lievaart-Peterson K, Lutikholt SJM, Van den Brom R, Vellema P (2012) Schmallenberg virus infection in small ruminants First review of the situation and prospects in Northern Europe. *Small Ruminant Research* *In press*
- Linthicum KJ, Davies FG, Kairo A, Bailey CL (1985) Rift Valley fever virus (family *Bunyaviridae*, genus *Phlebovirus*). Isolations from Diptera collected during an inter-epizootic period in Kenya. *Journal of Hygiene* 95(1):197-209
- López AC, Sánchez-Botija C (1958) Epizootie de fièvre catarrhale ovine en Espagne (blue tongue). *Bulletin Office International des Epizooties* 50:65-93
- López G, Jimenez-Clavero A, Gomez-Tejedor C, Soriguer R, Figuerola J (2008) Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in Spain is related to the behavior of migratory birds. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8 (5):615-621
- López-Olvera JR, et al. (2010) Experimental infection of European red deer (*Cervus elaphus*) with bluetongue virus serotypes 1 and 8 *Veterinary Microbiology* 145:148-152
- López-Velez R, Viana A, Perez-Casas C, Martin-Aresti J, Turrientes MC, Garcia-Camacho A (1999) Clinicoepidemiological study of imported malaria in travelers and immigrants to Madrid. *Journal of Travel Medicine* 6 (2):81-86
- Lucientes J, Calvete C, Estrada R, Miranda MA, Del Rio R, Borrás D (2008) Los vectores de la lengua azul: conocimientos básicos de su bioecología. El Programa nacional de vigilancia entomológica de la lengua azul en España. XXXIII Jornadas Científicas y XXII Internacionales, Almería
- McLean RG, Ubico SR, Bourne D, Komar N (2002) West Nile virus in livestock and wildlife. *Japanese Encephalitis and West Nile Viruses* 267:271-308
- MacLachlan NJ, Drew CP, Darpel KE, Worwa G (2009) The pathology and pathogenesis of bluetongue. *Journal of Comparative Pathology* 141: 1-16
- MacLachlan NJ (2010) Global implications of the recent emergence of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* 26(1):163-171
- Madon MB, Mulla MS, Shaw MW, Kluh S, Hazelrigg, JE (2002) Introduction of *Aedes albopictus* (Skuse) in southern California and potential for its establishment. *Journal Vector Ecology* 27: 149-154
- Marra PP, et al. (2004) West Nile virus and wildlife. *Bioscience* 54 (5):393-402
- Marquardt WC (2005) *Biology of Disease Vectors*. Elsevier Science and Technology, London
- Matsumoto Y, Yanase T, Tsuda T, Noda H (2009) Characterization of internal transcribed spacer (its1)-its2 region of ribosomal rna gene from 25 species of culicoides biting midges (Diptera: *Ceratopogonidae*) in Japan. *Journal of Medical Entomology* 46 (5):1099-1108

- Mavale MS, Ilkal MA, Dhanda V (1992) Experimental studies on the susceptibility of *Aedes vittatus* to dengue viruses. *Acta Virologica* 36(4):412-416
- Mavale MS, Fulmali PV, Ghodke YS, Mishra AC, Kanojia P, Geevarghese G (2007) Experimental transmission of Chandipura virus by *Phlebotomus argentipes* (Diptera : *Psychodidae*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76(2):307-309
- Meiswinkel R, Venter GJ, Nevill EM (2004) Vectors: *Culicoides* spp. In: Goetzer JAW, Tustin RC (eds) *Infectious diseases of livestock*. Oxford University Press, Oxford 1: 93-136
- Meiswinkel R, van Rijn P, Leijts P, Goffredo M (2007) Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe *Veterinary Record* 161:564-565
- Mehlhorn H, et al. (2007) First occurrence of *Culicoides obsoletus* transmitted bluetongue virus epidemic in Central Europe. *Parasitology Research* 101 :219-28
- Mellor PS, Boned J, Hamblin C, Graham S (1990) Isolations of African horse sickness virus from vector insects made during the 1988 epizootic in Spain. *Epidemiology and Infection* 105(2):447-454
- Mellor PS, Hamblin C (2004) African horse sickness. *Veterinary Research* 35: 445-466
- Mendoza-Montero J, Gamez-Rueda MI, Navarro-Mari JM, de la Rosa-Fraile M, Oyonarte-Gomez S (1998) Infections due to sandfly fever virus serotype Toscana in Spain. *Clinical Infectious Diseases* 27 (3) :434-436
- Mills JN, Gage KL, Khan AS (2010) Potential influence of climate change on vector-borne and zoonotic diseases: a review and proposed research plan. *Environmental Health Perspectives* 118(11):1507-1514
- Miranda MA, Rincon C, Borrás D (2004) Seasonal abundance of *Culicoides imicola* and *C. obsoletus* in the Balearic islands. *Veterinaria Italiana* 40: 292-295
- Molina R, et al. (2012) The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary Parasitology In press*
- Molyneux DH (2003) Common themes in changing vector-borne disease scenarios. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 97: 129–132
- Mourao MPG, et al. (2009) Oropouche fever outbreak, Manaus, Brazil, 2007-2008. *Emerging Infectious Diseases* 15(12):2063-2064
- Munstermann L (2005) Phlebotomine Sand Flies, the Psychodidae. In: Marquardt WC (ed) *Biology of Disease Vectors*. Elsevier Science and Technology, London 141-150
- Ofulla AVO, et al. (2010) Relative abundance of mosquitoes and snails associated with water hyacinth and hippo grass in the Nyanza gulf of Lake Victoria. *Lakes and Reservoirs: Research and Management* 15: 255–271
- OMS (2008) World Malaria Global Malaria Programm. WHO 246
- Ostfeld SR, Keesing F (2000) Biodiversity and Disease Risk: the Case of Lyme Disease. *Conservation Biology* 14: 722–728
- Pampiglione S, Canestri Trotti G, Rivasi F (1995) Human dirofilariasis due to *Dirofilaria* (*Nochtiella*) *repens*: a review of world literature. *Parassitologia* 37(2-3):149-93
- Pampiglione S, Rivasi F, Trotti GC (2000) Molecular diagnosis of *Dirofilaria repens* is not a dream. Reply. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 37(1):81-82
- Papa A, Xanthopoulou K, Gewehr S, Mourelatos S (2011) Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clinical Microbiology and Infection* 17(8):1176-1180

- Patz JA, Kovats RS (2002) Hotspots in climate change and human health *BMJ* 325:1094–1098
- Peralta PS, et al. (2010) First autochthonous malaria case due to *Plasmodium vivax* since eradication, Spain, October 2010. *Eurosurveillance* 15(41):2-4
- Petric D, Zgomba M, Bellini R, Veronesi R, Kaiser A, Becker N (1999) Validation of CO<sub>2</sub> trap data in three European regions. In: 3rd International Conference Insect, Pests in the Urban Environment, Prague.
- Pickering J, Fawcett L, Munstermann L (2012) An alternative approach: teaching evolution in a natural history museum through the topic of vector-borne disease. *Evolution Education and Outreach*:1-6
- Ponçon N, et al. (2007) Effects of local anthropogenic changes on potential malariavector *Anopheles hyrcanus* and West Nile virus vector *Culex modestus*, Camargue, France. *Emerging Infectious Disease* 13:1810–1815
- Ramsar (2004 ) Ramsar handbooks for the Wise Use of Wetlands, Gland
- RASVE (2012) Red de Alerta Sanitaria Veterinaria. Gobierno de España.  
<http://www.rasve.es>
- Rappole JH, Derrickson SR, Hubalek Z (2000) Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerging Infectious Diseases* 6(4):319-328
- Ready PD (2010) Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance* 15(10):29-39
- Reiter P, Sprenger D (1987) The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *Journal American Mosquitoes Control Association* 3: 494-501
- Reusken C, De Vries A, Den Hartog W, Braks M, Scholte EJ (2010) A study of the circulation of West Nile virus in mosquitoes in a potential high-risk area for arbovirus circulation in the Netherlands, "De Oostvaardersplassen". *European Mosquito Bulletin* 28:69-83
- Rezza G, et al. (2007) Infection with Chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370(9602):1840-1846
- Rioux JA, et al. (1997) L'évaluation écoépidémiologique du «risque leishmanien» au Sahara atlantique marocain. Intérêt heuristique de la relation "Phlébotomes-bioclimats" *Ecologia Mediterránea* 23: 73–92
- Ritchie SA, Kline DL (1995) Comparison of CDC and EVS light traps baited with carbon dioxide and octenol for trapping mosquitoes in Brisbane, Queensland (Diptera: *Culicidae*). *Journal of the Australian Entomological Society* 34:215-218
- Romi R (2001) *Aedes albopictus* in Italy: an underestimated health problem. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita* 37(2):241-247
- Rosenberg R, Ben Beard C (2011) Vector-borne Infections. *Emerging Infectious Diseases* 17(5):769-770
- Rossi E, et al. (2008) Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural Leishmania infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: *Psychodidae*) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Tropica* 105: 158-165
- Rowley WA, Jorgense N (1967) Relative effectiveness of 3 types of light traps in collecting adult *Culicoides* . *Journal of Economic Entomology* 60 (5):1478-1485
- Rueda SJ, Hernández VR (2008) Contribución al conocimiento de los culicidos del municipio de Torreblanca (Castellón, España) (Diptera: *Culicidae*). *Boletín de la Asociación Española Entomológica* 32:315-325

- Ruiz-Fons F, Reyes-Garcia AR, Alcaide V, Gortázar C (2008) Spatial and temporal evolution of bluetongue virus in wild ruminants, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 14(6):951-953
- Ruiz-Fons F, Gilbert L (2010) The role of deer (*Cervus elaphus* and *Capreolus capreolus*) as vehicles to move ticks *Ixodes ricinus* between contrasting habitats. *International Journal of Parasitology* 40:1013–1020
- Sanbonmatsu-Gamez S, et al. (2005) Toscana virus in Spain. *Emerging Infectious Diseases* 11(11):1701-1707
- Sanchís-Bayarri V (1974) Contribución al estudio de la serología de las infecciones por Arbovirus. *Hospital General* 14:417-424
- Sanders CJ, et al. (2011), Influence of season and meteorological parameters on flight activity of *Culicoides* biting midges. *Journal of Applied Ecology* 48: 1355–1364
- Santos L, Simoes J, Costa R, Martins S, Lecour H (2007) Toscana virus meningitis in Portugal, 2002-2005. *Eurosurveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles European Communicable Disease Bulletin* 12(6):3-4
- Savini G, et al. (2011) Epizootic heamorrhagic disease. *Research in Veterinary Science* 91: 1–17
- Schaffner F, Karch S (2000) First record of *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) in metropolitan France. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* 323(4):373-375
- Scharlemann JPW, Johnson PJ, Smith AA, Macdonald DW, Randolph SE (2008) Trends in ixodid tick abundance and distribution in Great Britain. *Medical and Veterinary Entomology* 22:238–247
- Schmidt-Chanasit J, Haditsch M, Schöneberg I, Günther S, Stark K, Frank C. (2010) Dengue virus infection in a traveller returning from Croatia to Germany. *Euro Surveillance* 15(40)
- Schmidt PL (2009) Companion Animals as Sentinels for Public Health. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice* 39(2):241-250
- Schwartz-Cornil I, et al. (2008) Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Veterinary Research* 39(5) :39:46
- Semenza JC, Menne B (2009) Climate change and infectious diseases in Europe. *Lancet Infectious Diseases* 9(6):365-375
- Service MW (1978) The effect of weather on mosquito biology Wheater and parasitic animal disease. *World Metereological Organisation, Geneva* 15: 151-167
- Simon F, Lopez-Belmonte J, Marcos-Atxutegi C, Morchon R, Martin-Pacho JR (2005) What is happening outside North America regarding human dirofilariasis? *Veterinary Parasitology* 133(2-3):181-189
- Snow K (1999) Malaria and mosquitoes in Britain: the effect of global climate change. *European Mosquito Bulletin* 4:17-25
- Sobrino R, et al. (2008) Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology* 155(3-4):198-203
- Stuckler D, Basu S, McKee M, Suhrcke M (2010) Responding to the economic crisis: a primer for public health professionals. *Journal of Public Health* 32(3):298-306
- Sudia WD, Chamberlain RW (1962) Battery-operated light trap, an improved model. *Mosquito News Albany NY* 22:126-129
- Sutherst RW (2004) Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clin Microbiol Rev* 17:136–173
- Tabachnick WJ (2010) Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epistystems in a changing world. *Journal of Experimental Biology* 213: 946-954

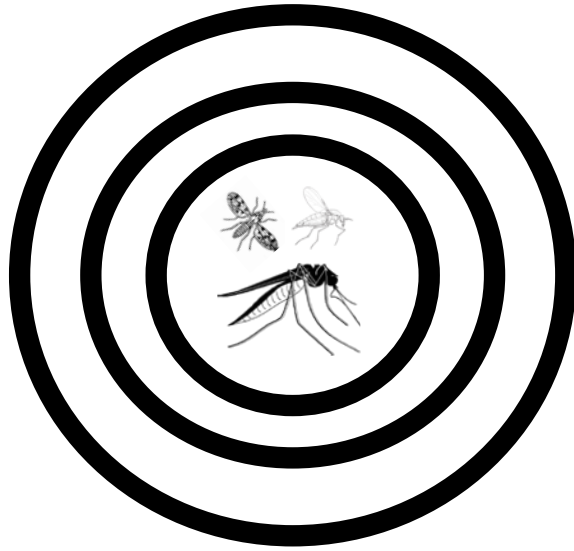
- Tesh RB, Guzman (1996) Sand flies and the agents they transmit. In the biology of disease vectors Beaty B Marquardt W. *Biology of Disease Vectors*. Elsevier Science and Technology, London 117-127
- Temizel EM, Yesilbag K, Batten C, Senturk S, Maan NS (2009) Epizoot ic hemorrhagic disease in cattle, Western Turkey. *Emerging Infectious Diseases Journal* 15:317–319
- Traore-Lamizana M, Zeller HG, Mondo M, Hervy J-P, Adam F, Digoutte J-P (1994) Isolations of West Nile and Bagaza viruses from mosquitoes (Diptera: *Culicidae*) in central Senegal (Ferlo). *Journal Medical Entomology* 31: 934–938
- Turell MJ, Wilson WC, Bennett KE (2010) Potential for North American mosquitoes (Diptera: *Culicidae*) to transmit rift valley fever virus. *Journal of Medical Entomology* 47: 884-889
- Tempelis CH (1975) Host-feeding patterns of mosquitoes, with a review of advances in analysis of blood meals by serology. *Journal of Medical Entomology* 11:635-653
- Tesh R, Saidi S, Javadian E, Loh P, Nadim A (1977) Isfahan virus, a new vesiculo-virus infecting humans, gerbils, and sandflies in Iran. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 26(2):299-306
- Traore-Lamizana M, Zeller HG, Mondo M, Hervy J-P, Adam F, Digoutte J-P (1994) Isolations of West Nile and Bagaza viruses from mosquitoes (Diptera: *Culicidae*) in central Senegal (Ferlo). *J Med Entomol* 31: 934–938
- Turell MJ (1989) Effect of environmental temperature on the vector competence of *Aedes fowleri* for Rift Valley fever virus. *Research in Virology* 140(2):147-154
- Turell MJ, Perkins PV (1990) Transmission of Rift Valley fever virus by the sand fly, *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: *Psychodidae*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42(2):185-188
- Valassina M, Meacci F, Valensin PE, Cusi MG (2000) Detection of neurotropic viruses circulating in Tuscany: The incisive role of Toscana virus. *Journal of Medical Virology* 60(1):86-90
- Van den Brom R, et al. (2012) Epizootic of ovine congenital malformations associated with Schmallenberg virus infection. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde* 137(2):106-111
- Vazquez A, et al. (2010) Putative New Lineage of West Nile Virus, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 16(3):549-552
- Vazquez A, et al. (2011) Short Report: West Nile and Usutu Viruses in Mosquitoes in Spain, 2008-2009. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85(1):178-181
- Venter GJ, Hermanides KG (2006) Comparison of black and white light for collecting *Culicoides imicola* and other livestock-associated *Culicoides* species in South Africa. *Veterinary Parasitology* 142(3-4):383-385
- Vicente J, et al. (2007) Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. *Veterinary Research* 38: 451–464
- Vinogradova EB (2000) *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control, Sofia
- Vora N (2008) Impact of anthropogenic environmental alterations on vector-borne diseases. *Medscape Journal Medical* 10: 238
- Walsh JF, Molyneux DH, Birley MH (1993) Deforestation: effects on vector-borne disease. *Parasitology* 106: 55–75

- Weiss RA, McMichael AJ (2004) Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. *Nature Medicine* 10(12):70-76
- 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. *Emergence Infectious Disease* 8:652-656
- Weissenbo H, Hubalek Z, Bakonyi T, Nowotny N (2010) Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: Worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Veterinary Microbiology* 140:271-280
- Weller PF, Simon HB, Parkhurst BH, Medrek TF (1978) Tourism-acquired *Mansonella ozzardi* microfilaremia in a regular blood-donor. *Jama-Journal of the American Medical Association* 240(9):858-859
- Weng MH, Lien JC, Lin CC, Yao CW (2000) Vector competence of *Culex pipiens molestus* (Diptera : *Culicidae*) from Taiwan for a sympatric strain of Japanese encephalitis virus. *Journal of Medical Entomology* 37(5):780-783
- Wieserschimpf L, Foil LD, Holbrook FR (1990) Comparison of New Jersey light traps for collection of adult *Culicoides variipennis* (Diptera: *Ceratopogonidae*). *Journal of the American Mosquito Control Association* 6(3):537-538
- Williams MC, Simpson DI, Haddow AJ, Knight EM (1964) The isolation of West Nile virus from man and of Usutu virus from the bird-biting mosquito *Mansonia aurites* (Theobald) in the Entebbe area of Uganda *Annals of Tropical Medicine Parasitology* 58: 367–374
- Yanase T, Maeda K, Kato T, Nyuta S, Kamata H, Yamakawa M, Tsuda T (2005) The resurgence of Shamonda virus, an African Simbu group virus of the genus *Orthobunyavirus*, in Japan. *Archives of Virology* 150: 361–369



# Objetivos

---





## Objetivos

### Objetivo general:

Aportar conocimientos entomológicos que contribuyan al entendimiento de las enfermedades transmitidas por dípteros y conocer a través de ellos el riesgo sanitario actual y potencial que representan estos organismos para la salud pública y la sanidad animal en el centro-sur de la península ibérica, en concreto en la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha.

### Objetivos específicos:

- 1) Determinar cuál es la composición y distribución de las poblaciones de dípteros de la familia *Culicidae* predominantes en ambientes acuáticos no urbanos en el amplio gradiente ambiental y climático del centro-sur de la península ibérica (**Capítulo 1**).
- 2) Establecer cuáles son los riesgos sanitarios potenciales para animales y personas asociados a dípteros de la familia *Culicidae* en ambientes acuáticos no urbanos del centro-sur de la península ibérica con la finalidad de establecer prioridades futuras de investigación de enfermedades transmitidas por culícidos (**Capítulo 1**).
- 3) Establecer en detalle qué factores ecogeográficos – localización espacial, clima, hábitat y hospedadores - modulan la abundancia en poblaciones de *Culex pipiens* en ambientes acuáticos no urbanos del centro-sur de la Península Ibérica (**Capítulo 2**).
- 4) Evaluar la composición y distribución de las poblaciones de jejenes (Diptera: *Ceratopogonidae*) de importancia en salud pública y sanidad animal en el amplio gradiente ambiental y climático del centro-sur de la península ibérica (**Capítulo 3**).

- 5) Proporcionar información sobre las especies de jejenos probablemente implicadas en los ciclos de vida de *Orbivirus* en ambientes continentales mediterráneos no ganaderos de la península ibérica (**Capítulo 3**).
- 6) Determinar la presencia y distribución de las especies de flebótomos (Diptera: *Psychodidae*) de interés en salud pública y sanidad animal en zonas no urbanas del centro-sur de la península ibérica (**Capítulo 4**).
- 7) Determinar la presencia de *Leishmania infantum* en flebótomos en Castilla – La Mancha y, en base a la presencia de *L. infantum* y a la distribución y abundancia de sus vectores, establecer las zonas de riesgo en el centro-sur de la península ibérica (**Capítulo 4**).

# Capítulo 1

---



**Spatial ecology - distribution, abundance and community  
composition - of mosquitoes (Diptera: *Culicidae*) in  
continental Mediterranean environments: implications for  
public and animal health**

Mauricio Durán-Martínez, Pelayo Acevedo, Javier Lucientes, AnaValeria Gutiérrez-  
Guzmán, Christian Gortázar, Francisco Ruiz-Fons

*Acta Tropica* (en revisión)



---

## **Ecología especial, distribución, abundancia y composición de las poblaciones de mosquitos (Diptera: *Culicidae*) en hábitats Mediterráneos: implicaciones a la salud pública y animal**

### **Resumen**

A pesar de la preocupación actual sobre la emergencia de enfermedades transmitidas por mosquitos en la cuenca mediterránea, la información existente sobre la distribución, la abundancia y la composición de las comunidades de mosquitos en el área es escasa. Por ello, se diseñó un muestreo de mosquitos en 39 localidades en cinco regiones climáticas en Castilla – La Mancha en tres periodos diferentes entre los años 2009 y 2010. Se utilizaron trampas de luz tipo CDC. Se capturaron 783 mosquitos de 6 géneros distintos (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*, *Ochlerotatus* y *Uranotaenia*) y 19 especies. Las especies de los géneros *Anopheles*, *Culex* y *Culiseta* presentaron una amplia distribución en contraste con *Aedes*, *Ochlerotatus* y *Uranotaenia* que fueron más restringidas geográficamente. Especies del complejo *Culex pipiens* supusieron el 64,6±3,4% de las capturas y estuvieron presente en 24 de las 39 localidades. Otras 4 especies siguieron en abundancia: *Cx. theileri* (7,0±1,8%), *Culiseta annulata* (5,5±1,6%), *Cs. subochrea* (3,8±1,4%) y el complejo *Anopheles maculipennis* (2,8±1,2%). La mayor abundancia de mosquitos, y particularmente de *Cx. pipiens*, se observó en regiones climáticas medianamente templadas y relativamente llanas y secas. El pico de abundancia de *Cx. pipiens* se observó en verano-otoño. Estos resultados mostraron que el mayor riesgo de enfermedades transmitidas por mosquitos proviene de aquellos patógenos en los que *Cx. pipiens* es un vector relevante, como el virus de WN, el virus Usutu, el virus de la fiebre del Valle del Rift o el virus Sindbis, entre otros. Sin

embargo, la baja abundancia de especies del género *Anopheles* sugiere que el riesgo de reemergencia de la malaria humana es bajo aunque no despreciable. Esta información es básica para el futuro análisis de factores de riesgo de las enfermedades transmitidas por mosquitos de mayor importancia en zonas interiores de la cuenca mediterránea.

### **Abstract**

In spite of the current concern on the emergence of mosquito-borne diseases in the Mediterranean basin, information on the distribution, abundance and composition of the mosquito communities in this area is scarce. For this reason, a mosquito survey was conducted in 39 locations within five climatic regions in Castilla – La Mancha (central - Spain) in three different periods between 2009 and 2010. We used CDC light traps. A total of 783 adult mosquitoes were captured, six genera (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*, *Ochlerotatus* and *Uranotaenia*) and 19 species. Species in the genera *Anopheles*, *Culex* and *Culiseta* were widely distributed in the study area while *Aedes*, *Ochlerotatus* and *Uranotaenia* species were more restricted geographically. *Culex pipiens* accounted for the  $64.6 \pm 3.4\%$  of the captures and was captured in 24 of the 39 locations surveyed. Other 4 species followed in abundance: *Cx. theileri* ( $7.0 \pm 1.8\%$ ), *Culiseta annulata* ( $5.5 \pm 1.6\%$ ), *Cs. subochrea* ( $3.8 \pm 1.4\%$ ) and *Anopheles maculipennis* complex ( $2.8 \pm 1.2\%$ ). The highest abundances of mosquitoes, and particularly of *Cx. pipiens*, were observed in intermediate temperate and relatively flat and dry climatic regions. The peak of abundance of *Cx. pipiens* was observed in summer-autumn. According to these findings, the highest risk of mosquito-borne diseases in these Mediterranean environments is for those pathogens for which *Cx. pipiens* is a relevant vector, such as West Nile virus, Usutu virus, Rift Valley Fever virus or Sindbis virus, among others. In contrast, the low abundance of *Anopheles* spp. suggests that the risk of



re-emergence of human malaria is low although not negligible. This information will constitute the basis for future risk factor analyses of the most relevant mosquito-borne pathogens in inland areas of the Mediterranean basin.

## **Introduction**

Currently, vector-borne pathogens are one of the main causes of emerging diseases worldwide (Becker et al. 2010). Among the different groups of blood-sucking arthropods that act as vectors of disease, mosquitoes (Diptera: *Culicidae*) transmit the major part of the vector-borne pathogens causing disease in humans (Estrada-Peña and Jongejan 1999), and are second to ticks in transmitting diseases to animals (Estrada Peña and Jongejan 1999; Sonenshine et al., 2002). The World Health Organization estimated that 247 million clinical cases and one million deaths around the world in 2006 were caused by mosquito-borne diseases (WHO 2008). In addition, health authorities in many countries expend millions of Euros annually to control and mitigate the devastating consequences of these insects (Becker et al. 2010). Thus, in the context of public and animal health, the study of the biology and ecology of mosquitoes seems essential for preventing the associated risks while improving the cost-benefit ratio of control measures.

Mosquitoes are insects of the family *Culicidae* intimately associated to aquatic environments in which they develop. Females are hematophagous because a blood meal is usually required to complete the development of eggs, while males usually feed on plants. Females lay egg batches in the water of aquatic environments or artificial water reservoirs, though females of the genus *Aedes* and some females of the genera *Ochlerotatus* and *Culiseta* choose soils that will later be flooded to lay their eggs (Bueno-Marí and Jiménez-Peydró 2011). Mosquitoes have extraordinarily adapted to

prosper in many different environments, from tropical to temperate climates. This great adaptability makes some of them able to temporarily or permanently colonize natural sites, urban and rural areas, polluted or unpolluted aquatic environments (Becker et al. 2010).

Although more than the 75% of the known species of mosquitoes are natural residents of the tropics and subtropics (Becker et al. 2010), many species have stable populations in temperate areas, such as the Mediterranean basin. Mediterranean countries are at a high risk of potential invasion and establishment of exotic mosquito species, such as *Aedes koreicus* in Italy (Bueno-Marí and Jiménez-Peydró 2011; Capelli et al. 2011) or the renowned Asian tiger mosquito – *Ae. albopictus* – that first appeared in Albania in 1979 and since then has slowly but efficiently spread westward until eastern Spain (Dalla Pozza and Majori 1992; Schaffner and Karch 2000; Aranda et al. 2006; Roiz et al. 2007; Delacour et al. 2009; Bueno-Marí et al. 2010). This is not likely a result of chance but a consequence of changes in human activities (Becker et al. 2010) increased transport of people and goods, migratory movements and climate change (Gale et al. 2010; Manguin and Boëte 2011) Only 92 of the 3200 mosquito species known worldwide have been described in Europe (Becker et al. 2010). Peninsular Spain accounts for a high diversity within Europe with 60 reported mosquito species (Carles Tolrá 2002).

Vector-borne pathogens are diverse, including viruses, bacteria and parasites (Rosenberg and Ben Beard 2011). Mosquito-borne disease epidemics occur mainly in tropical countries (Becker et al. 2010), although several outbreaks have recently appeared in temperate countries of the Mediterranean basin such as the outbreaks of West Nile Virus (WNV) in France, Portugal, Spain and Italy (Reusken et al. 2010; García Bocanegra et al. 2011) and the Chikungunya virus (CHV) outbreak in Italy

(Reusken et al. 2010). The expansion of tropical mosquitoes into temperate areas may carry over the risk of introduction of tropical mosquito-borne diseases, such as Rift Valley fever (Moutailler et al. 2008) that recently reached the north of Mauritania (El Mamy et al. 2011). The emergence of CHV in Italy and Bluetongue virus – transmitted by *Culicoides* spp. in Europe (Purse et al. 2005; Landeg 2007; Mehlhorn et al. 2007) are good examples. The risk of introduction of exotic vector-borne diseases to the Iberian Peninsula is high due to two main features: i) its geographic location between tropical and temperate climates that makes it a good “European door” to central European countries through northern Africa; and ii) the presence of stable populations of mosquitoes that can be competent vectors of tropical pathogens, such as the causal agent of human Malaria, *Plasmodium vivax* (Bueno-Marí and Jiménez-Peydró 2008). In addition, the recent establishment of *Ae. albopictus* in some Spanish regions (Bueno-Marí and Jiménez-Peydró 2008; Rueda and Hernández 2008; Collantes and Delgado 2011) increases concerns about the potential emergence of Yellow Fever and Dengue (Becker et al. 2010). Monitoring of mosquitoes and transmitted pathogens is thus highly recommendable in the Iberian Peninsula.

Several European regions have established active surveillance programmes to prevent the expansion and emergence of mosquito-borne pathogens (Weissenboeck et al. 2010), enhancing knowledge on the distribution, abundance and diversity of mosquitoes and on the environmental factors that keep them linked to a territory as well. However, there is still a need to evaluate the distribution and abundance of mosquitoes through wide territories in the Mediterranean basin. The information available about the distribution, abundance and community composition of the culicids in Mediterranean environments of inland Iberia is scarce (Encinas-Grandes 1982). Thus, the main objective of this work was to cover this important gap in knowledge in order to provide

a scientific basis for future research on risks of mosquito-borne pathogen emergence. Githeko et al. (2001) noted that risks to health increase in regions where the preventive health infrastructure is not the appropriate; improving knowledge on the vectors would enhance the chance to fight against the emergence of mosquito-borne diseases in the Mediterranean basin.

## **Material and methods**

### *Study area and sampling site selection criteria*

The Spanish Autonomous Community of Castilla - La Mancha (CLM) extends over 79.463 km<sup>2</sup> in the Spanish Plateau, constituting 15.7% of the mainland Spanish territory. Orographically it is a broad plateau with altitudes ranging between 600 and 1.000 m that includes different mountain ranges up to 2.000 m. The region is climatically characterized by the predominance of a Mediterranean climate with extreme temperature ranges (cold winters and very hot summers) and an average rainfall of 400 mm with large seasonal contrasts (Giménez 1999).

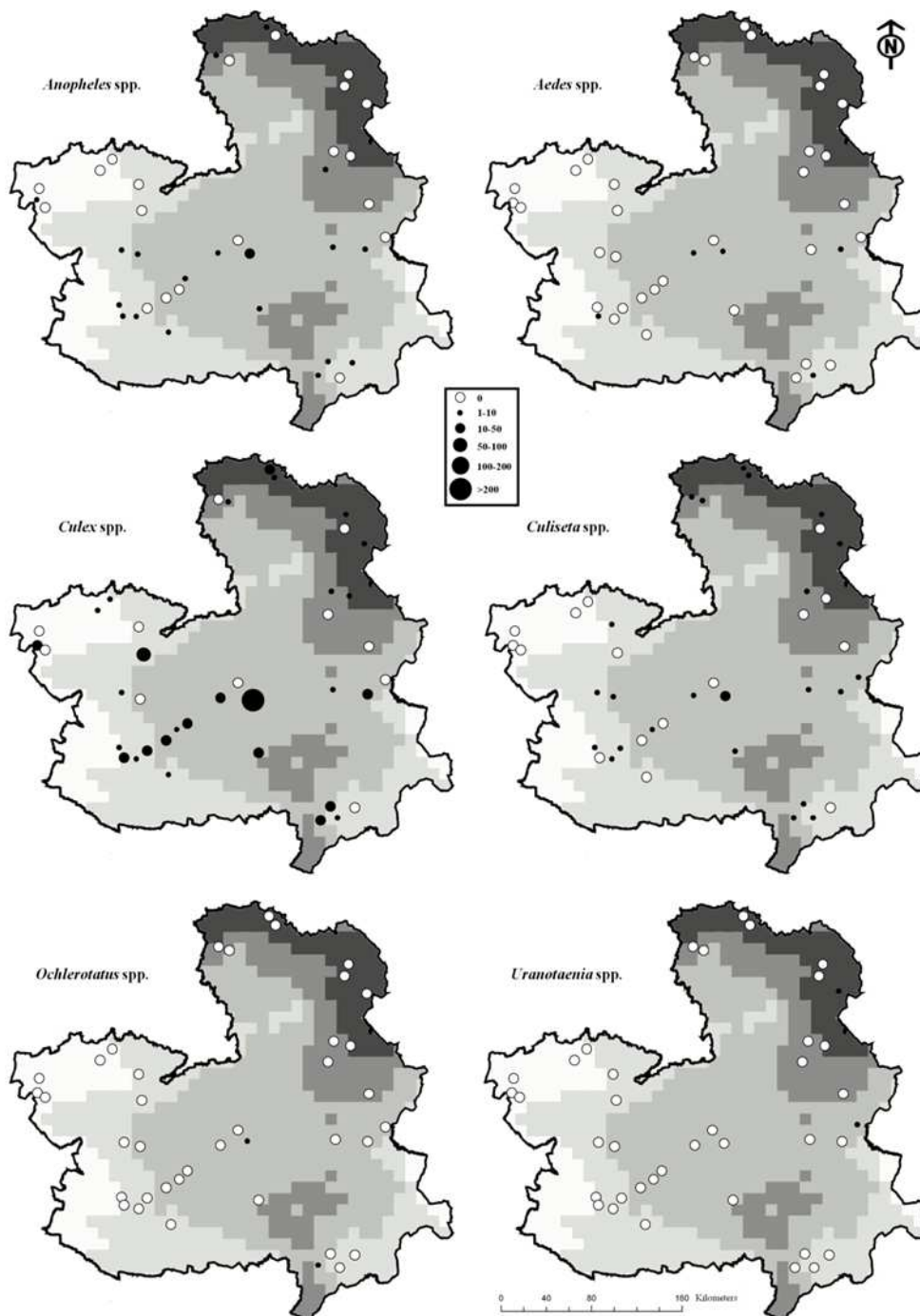
Climatic conditions may greatly vary between different environments in CLM mainly due to altitude and geographic location. Thus, in order to stratify the survey the main climatic regions in CLM were determined. For this, the 905 UTM 10x10 km squares in CLM were characterized by 27 climatic and spatial variables (Table 1). A Principal Component Analysis (PCA) was performed over these variables and the first factor retained from the PCA was used to climatically regionalize the study area. The values of the first factor were classified by using Jenks Natural Breaks Classification method (Jenks 1967). This method optimizes the classification of continuous data into discrete categories by reducing the variance within each class while maximizing the

variance between classes. We obtained five different climatic regions in our study area that were taken into account for selection of the sampling sites (Fig. 1).

For each climatic region sampling sites were randomly selected from 10x10 UTM squares with permanent water bodies (i.e. rivers, lagoons or lakes) in a proportional number to the surface of each region, being 39 the total number of selected squares. Within each selected square the concrete sampling site was selected to be close to permanent water sources mainly artificial reservoir lakes, rivers and ponds along water streams, and accessible by roads or paths in order to minimize sampling efforts. In our study area, streams may become dry during the summer season but small water ponds remain. Sampling sites were selected from the standpoint of their likelihood of being appropriate breeding habitats for culicids.

**Table 1.** Environmental variables gathered for each of the 905 10x10 km UTM squares of the study region and their relation with the first factor obtained from the principal component analysis (PCA). The mean value of every variable at each climatic region obtained with the PCA factor (see text and Figure 1) and its associated standard error within brackets) are also shown.

Variable	Factor	Bioclimatic region				
		1	2	3	4	5
Longitude (m) <sup>1</sup>	-0.321	56.5 (0.6)	55. (0.3)6	52.1 (0.3)	47.1 (0.7)	38.9 (0.9)
Latitude (m) <sup>1</sup>	-0.652	452.0 (0.4)	441.2 (0.9)	437.4 (0.4)	433.9 (0.5)	435.9 (0.6)
Difference in altitude (m)	-0.407	368.2 (20.1)	331.5 (16.7)	198.6 (9.4)	317.2 (12.4)	293.2 (12.4)
Mean annual no. of days with hail <sup>2</sup>	-0.518	4.3 (0.2)	3.5 (0.1)	2.9 (0.1)	2.4 (0.1)	2.9 (0.1)
Mean annual no. of frost days <sup>2</sup>	-0.760	105.3 (0.7)	79.5 (1.1)	69.5 (0.4)	51.1 (0.9)	36.8 (0.6)
Mean annual no. of days with precipitation >0.1mm <sup>2</sup>	-0.599	79.0 (1.9)	70.1 (1.2)	61.8 (0.5)	58.1 (0.9)	61.1 (0.8)
Mean annual no. of foggy days <sup>2</sup>	-0.792	18.0 (0.7)	12.4 (0.6)	4.2 (0.1)	2.0 (0.1)	1.1 (0.1)
Runoff (mm)	-0.484	158.9 (13.1)	148.1 (8.8)	60.4 (4.4)	77.8 (5.8)	154.0 (10.9)
Average annual potential evapotranspiration (mm) <sup>2</sup>	0.856	654.0 (2.8)	733.5 (3.9)	786.7 (2.0)	818.5 (2.2)	850.2 (3.6)
Average annual actual evapotranspiration (mm)	-0.549	573.3 (8.2)	595.8 (8.7)	461.3 (4.9)	467.0 (6.5)	609.4 (10.5)
Mean relative air humidity in January (HUJ; %) <sup>2</sup>	0.424	87.0 (0.2)	88.2 (0.2)	90.4 (0.1)	88.6 (0.2)	89.3 (0.3)
Mean relative air humidity in July (HUJU; %) <sup>2</sup>	-0.534	70.6 (0.3)	65.5 (0.5)	63.2 (0.2)	62.2 (0.3)	62.7 (0.6)
Continental index <sup>2,3</sup>	0.235	21.6 (0.9)	26.1 (0.8)	29.0 (0.5)	29.1 (0.6)	28.5 (0.7)
Moisture Index <sup>2,4</sup>	-0.593	88.3 (3.2)	73.1 (2.6)	56.2 (1.1)	52.4 (1.4)	62.5 (2.0)
Mean annual insolation (hours year <sup>-1</sup> ) <sup>2,5</sup>	0.857	24.8 (0.1)	27.5 (0.1)	28.9 (0.0)	28.7 (0.0)	29.3 (6.9)
Rainfall regularity	0.286	28.7 (0.2)	30.9 (0.2)	30.9 (0.1)	30.8 (0.1)	30.0 (0.1)
Slope (degrees)	-0.444	3.0 (0.2)	2.8 (0.2)	1.5 (0.1)	2.4 (0.1)	2.3 (0.1)
Soil permeability	0.066	2.4 (0.1)	2.5 (0.1)	2.5 (0.0)	2.0 (0.1)	2.0 (0.1)
Average annual accumulated precipitation (P; mm) <sup>2</sup>	-0.647	684.1 (22.6)	621.8 (12.3)	464.0 (5.7)	473.4 (8.6)	621.1 (13.1)
Average annual maximum precipitation in 24 hours (PM24; mm) <sup>2</sup>	0.123	93.4 (1.9)	100.9 (2.3)	102.3 (1.6)	134.8 (2.8)	151.5 (4.8)
Average annual relative maximum precipitation (P/PM24)	0.460	0.1 (0.0)	0.2 (0.0)	0.2 (0.0)	0.3 (0.0)	0.3 (0.0)
Average annual solar radiation (Kwh m <sup>-2</sup> day <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	0.731	441.2 (1.4)	471.3 (1.4)	479.3 (0.5)	476.7 (0.5)	472.1 (0.6)
Mean temperature in January (TEJ; °C) <sup>2</sup>	0.876	0.8 (0.1)	3.3 (0.1)	4.5 (0.0)	5.3 (0.1)	6.1 (0.1)
Mean temperature in July (TEJU; °C) <sup>2</sup>	0.909	19.7 (0.1)	21.8 (0.1)	24.0 (0.1)	24.5 (0.1)	25.3 (0.1)
Average annual mean temperature (°C) <sup>2</sup>	0.906	9.5 (0.1)	11.7 (0.1)	13.5 (0.1)	14.2 (0.1)	14.9 (0.1)
Average annual air humidity range (HUJ-HUJU; %)	0.715	16.4 (0.3)	22.7 (0.5)	27.2 (0.2)	26.5 (0.2)	26.6 (0.5)
Average annual temperature range (TEJU-TEJ; %)	0.354	18.9 (0.1)	18.6 (0.1)	19.5 (0.1)	19.2 (0.1)	19.1 (0.1)



**Figure 1.** Maps of the study region showing the geographic distribution and the abundance of the six genera of culicids found in this work. Climatic regions 1 to 5 are represented by decreasing intensity in grey colour within the map (from dark grey for region 1 to white for region 5).

*Mosquito survey*

Mosquito surveys were conducted in three different periods in 2009 and 2010: autumn 2009, spring-summer 2010 and summer-autumn 2010. Surveys were not performed in winter because very cold conditions are expected to decrease the activity of mosquitoes to a minimum (Kilpatrick et al. 2006). A mosquito capture station was placed from dusk to dawn (approximately from 8:00 pm to 8:00 am) during one night per sampling site and period. A capture station consisted in three Centers for Disease Control (CDC) traps "Mosquito Light Trap" (Mod2504 *Curtis Dyna-FogUS*<sup>®</sup>, Westfield, USA), two of them equipped with a white (W) light lamp and one equipped with an ultraviolet (UV) light. Traps were hung from a horizontal structure to allow the light source to remain at a height of 1.5 m from the ground (Shin et al. 2005). Each of the 3 traps of a capture station was placed at a minimum distance of 20 m to avoid interferences with the rest. Capture stations were placed within 0 to 25 m from water bodies and protected from the wind by the vegetation. Each trap was checked at dawn, the basket catch withdrew and the captured insects placed in coolers for euthanasia. Once dead, insects were placed in 50 ml labelled containers, preserved in ice during transport and stored frozen at -80°C. Captured insects were classified into five different groups: i) culicids; ii) midges; iii) phlebotomines; iv) lepidopters; and v) other insects. The culicids were sexed, taxonomically identified to the species level (Schaffner et al. 2001; Becker et al. 2010) and quantified.

*Statistical analyses*

A descriptive analysis showed that the distribution of mosquito capture was highly aggregated within capture stations ( $n=109$ ;  $k=0.1$ ), which consequently conditioned the statistical approach to be employed. To control for the ability of the different light trap



types in collecting mosquitoes, the relative abundance of mosquitoes (number of captured mosquitoes  $\times$  night<sup>-1</sup>) every taxa together, and *Anopheles* spp., *Culex* spp., *Culex pipiens* and *Culiseta* spp. in separate – was compared between W (n=218) and UV light traps (n=109) by means of non-parametric Mann-Whitney U tests. The abundance of mosquitoes was calculated in relation to the number of traps of each type because a capture station had double W than UV light traps. Differences in the abundance of male and female mosquitoes at the capture station level, both globally and independently for each trap type, were analyzed by using Mann-Whitney U tests again. Finally, the relative abundance of mosquitoes in relation to water type (stream, river and lake) was compared, both globally and independently for each climatic region, by means of non-parametric Kruskal-Wallis tests.

In a second analytical approach the influence of sampling date, location and climatic region on the abundance of mosquitoes was assessed. For this purpose the abundance of mosquitoes at the capture station level every species together, and *Culex* spp. and *Culex pipiens* in separate was modelled with 4 variables: i) climatic region (5 categories); ii) sampling period (3 categories); iii) longitude (continuous); and iv) latitude (continuous). Only the most abundant genera and species were modelled independently since a minimum number of data are required for modelling and this was not achieved with every captured taxa. The modelling approach was run under a negative binomial distribution with a logarithmic link function due to the aggregated nature of mosquito captures. In order to control for local non-measured effects, sampling site was considered as a random variable within the generalized linear mixed model approach followed. The modelling approach was performed as reported elsewhere (Ruiz Fons et al. 2008). The statistical analyses were run in IBM-SPSS 19.0 software (IBM. Corporation. New York. USA).

## Results

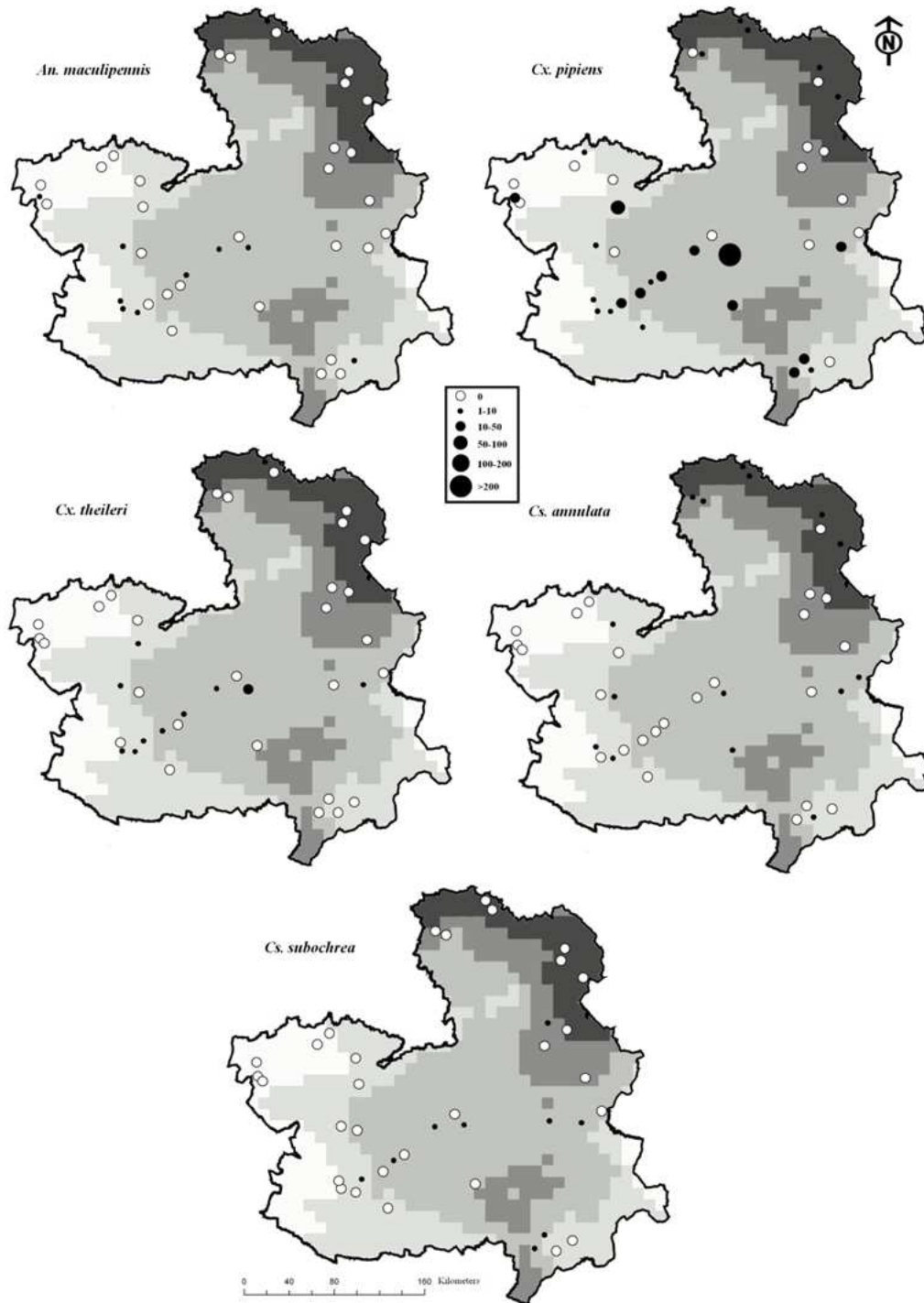
Globally, we captured 783 mosquitoes belonging to six genera: *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*, *Ochlerotatus* and *Uranotaenia*. From these, 19 different species were identified (Table 2).

The genus *Culex* accounted for the major part of catches ( $80.2\pm 2.8\%$ ) followed by *Culiseta* ( $11.4\pm 2.2\%$ ) and *Anopheles* ( $6.5\pm 1.7\%$ ). The largest proportion of catches of a particular species corresponded to *Cx. pipiens* ( $64.6\pm 3.4\%$ ) followed by *Cx. theileri* ( $7.0\pm 1.8\%$ ), *Cs. annulata* ( $5.5\pm 1.6\%$ ), *Cs. subochrea* ( $3.8\pm 1.4\%$ ) and *An. maculipennis* complex ( $2.8\pm 1.2\%$ ).

Species of the genera *Anopheles*, *Culex* and *Culiseta* were widely distributed in CLM; individuals of these genera were captured in the five climatic regions (Fig. 1). In contrast, the distribution of mosquitoes in the genera *Aedes*, *Ochlerotatus* and *Uranotaenia* was restricted to a few locations which belonged only to two different climatic regions at the time (Fig. 1). The highest abundance of *Cx. pipiens* was observed in the centre and south-west of the study area, in the climatic region 3 (Fig. 2), with 61.7% of the captures concentrated in only two points one of them concentrating more than the 40% of the captures. *Cx. pipiens* and *Cs. annulata* were the most widely distributed species in the study region (Fig. 2). *Cx. theileri*, *Cs. subochrea* and *An. maculipennis* complex were also widely distributed within the study region but in a more restricted fashion (Fig. 2).

**Table 2.** Results of mosquito species captured throughout climatic region. The table shows both the total number of captures (N) and the abundance index relative to the number of sampling points per climatic region (M) and its associated standard error (SE) at the species level. Summarizing rows additionally show the number of species captured within each

Species	Bioclimatic region											
	1		2		3		4		5		TOTAL	
	N	M (SE)	N	M (SE)	N	M (SE)	N	M (SE)	N	M (SE)	N	M (SE)
<i>An. spp.</i>	2	0.1 (0.1)	1	0.1 (0.1)	4	0.1 (0.1)	0	0.0 (0)	0	0.0 (0.0)	7	0.1 (0.03)
<i>An. algeriensis</i>	0	0.0 (0.0)	2	0.1 (0.1)	4	0.1 (0.1)	3	0.1 (0.1)	0	0.0 (0.0)	9	0.1 (0.04)
<i>An. claviger</i>	0	0.0 (0.0)	1	0.1 (0.1)	7	0.2 (0.1)	1	0.03 (0.03)	0	0.0 (0.0)	9	0.1 (0.03)
<i>An. maculipennis</i>	1	0.1 (0.1)	0	0.0 (0.0)	13	0.4 (0.4)	6	0.2 (0.1)	2	0.1 (0.1)	22	0.2 (0.1)
<i>An. marteri</i>	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	3	0.1 (0.1)	0	0.0 (0.0)	3	0.03 (0.02)
<i>An. plumbeus</i>	0	0.0 (0.0)	1	0.1 (0.1)	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	1	0.01 (0.01)
<b>Total <i>An. spp.</i></b>	<b>3 (1)</b>	<b>0.2 (0.2)</b>	<b>5 (3)</b>	<b>0.4 (0.3)</b>	<b>28 (3)</b>	<b>0.9 (0.5)</b>	<b>13 (4)</b>	<b>0.4 (0.2)</b>	<b>2 (1)</b>	<b>0.1 (0.1)</b>	<b>51</b>	<b>0.5 (0.2)</b>
<i>Ae. spp.</i>	0	0.0 (0)	0	0.0 (0.0)	6	0.2 (0.1)	1	0.03 (0.03)	0	0.0 (0.0)	7	0.1 (0.04)
<i>Ae. vexans</i>	0	0.0 (0)	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	1	0.03 (0.03)	0	0.0 (0.0)	1	0.01 (0.01)
<b>Total <i>Ae. spp.</i></b>	<b>0</b>	<b>0.0 (0.0)</b>	<b>0</b>	<b>0.0 (0.0)</b>	<b>6 (1)</b>	<b>0.2 (0.1)</b>	<b>2 (1)</b>	<b>0.1 (0.1)</b>	<b>0</b>	<b>0.0 (0.0)</b>	<b>8</b>	<b>0.07 (0.04)</b>
<i>Cx. spp.</i>	12	0.7 (0.5)	1	0.1 (0.1)	33	1.0 (0.8)	8	0.3 (0.1)	0	0 (0)	54	0.5 (0.3)
<i>Cx. pipiens</i>	11	0.7 (0.4)	1	0.1 (0.1)	316	9.9 (6.0)	150	4.8 (3.2)	28	1.9 (1.7)	506	4.6 (2.0)
<i>Cx. theileri</i>	3	0.2 (0.2)	0	0.0 (0.0)	36	1.1 (1.0)	16	0.5 (0.3)	0	0.0 (0.0)	55	0.5 (0.3)
<i>Cx. deserticola</i>	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	1	0.1 (0.1)	1	0.01 (0.01)
<i>Cx. univittatus</i>	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	1	0.03 (0.03)	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	1	0.01 (0.01)
<i>Cx. mimeticus</i>	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	4	0.1 (0.1)	0	0.0 (0.0)	2	0.1 (0.1)	6	0.1 (0.03)
<i>Cx. modestus</i>	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	1	0.03 (0.03)	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	1	0.01 (0.01)
<i>Cx. perexiguus</i>	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	3	0.1 (0.1)	1	0.03 (0.03)	0	0.0 (0.0)	4	0.04 (0.02)
<b>Total <i>Cx. spp.</i></b>	<b>26 (2)</b>	<b>1.5 (1.0)</b>	<b>2 (1)</b>	<b>0.1 (0.1)</b>	<b>394 (6)</b>	<b>12.3 (7.7)</b>	<b>175 (3)</b>	<b>5.7 (3.2)</b>	<b>31 (3)</b>	<b>2.1 (1.7)</b>	<b>628</b>	<b>5.8 (2.5)</b>
<i>Cs. spp.</i>	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	3	0.1 (0.1)	2	0.1 (0.1)	0	0.0 (0.0)	5	0.1 (0.03)
<i>Cs. annulata</i>	11	0.7 (0.4)	3	0.2 (0.1)	16	0.5 (0.3)	7	0.2 (0.2)	6	0.4 (0.4)	43	0.4 (0.1)
<i>Cs. longiareolata</i>	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	2	0.1 (0.1)	1	0.03 (0.03)	0	0.0 (0.0)	3	0.03 (0.02)
<i>Cs. morsitans</i>	2	0.1 (0.1)	0	0.0 (0.0)	5	0.2 (0.1)	1	0.03 (0.03)	0	0.0 (0.0)	8	0.1 (0.04)
<i>Cs. subochrea</i>	0	0.0 (0.0)	1	0.1 (0.1)	26	0.8 (0.4)	3	0.1 (0.1)	0	0.0 (0.0)	30	0.3 (0.1)
<b>Total <i>Cs. spp.</i></b>	<b>13 (2)</b>	<b>0.8 (0.5)</b>	<b>4 (2)</b>	<b>0.3 (0.1)</b>	<b>52 (4)</b>	<b>1.6 (0.7)</b>	<b>14 (4)</b>	<b>0.5 (0.2)</b>	<b>6(1)</b>	<b>0.4 (0.4)</b>	<b>89</b>	<b>0.8 (0.2)</b>
<i>O. caspius</i>	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	4	0.1 (0.1)	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	4	0.04 (0.03)
<b>Total <i>O. spp.</i></b>	<b>0</b>	<b>0.0 (0.0)</b>	<b>0</b>	<b>0.0 (0.0)</b>	<b>4 (1)</b>	<b>0.1 (0.1)</b>	<b>0</b>	<b>0.0 (0.0)</b>	<b>0</b>	<b>0.0 (0.0)</b>	<b>4</b>	<b>0.04 (0.03)</b>
<i>U. unguiculata</i>	2	0.1 (0.1)	0	0.0 (0.0)	1	0.1 (0.03)	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	3	0.03 (0.02)
<b>Total <i>U. spp.</i></b>	<b>2 (1)</b>	<b>0.1 (0.1)</b>	<b>0</b>	<b>0.0 (0.0)</b>	<b>1 (1)</b>	<b>0.1 (0.03)</b>	<b>0</b>	<b>0.0 (0.0)</b>	<b>0</b>	<b>0.0 (0.0)</b>	<b>3</b>	<b>0.03 (0.02)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>44 (6)</b>	<b>2.6 (1.7)</b>	<b>12 (6)</b>	<b>0.8 (0.3)</b>	<b>485 (16)</b>	<b>15.2 (8.9)</b>	<b>204 (12)</b>	<b>6.6 (3.2)</b>	<b>39 (5)</b>	<b>2.6 (1.7)</b>	<b>783</b>	<b>7.2 (2.8)</b>



**Figure 2.** Maps of the study region showing the geographic distribution and the abundance of each of the five most abundant culicid species in the study region. Climatic regions 1 to 5 are represented by decreasing intensity in grey colour within the map (from dark grey for region 1 to white for region 5).

There were slight variations in the abundance index of mosquitoes captured with W ( $2.1 \pm 0.9$  mosquitoes/trap) and UV ( $2.9 \pm 1.2$  mosquitoes/trap) light traps that were

statistically non-significant. This pattern of captures was similar for each genus and also for *Cx. pipiens*. Differences in the abundance of both sexes were also statistically non-significant, with similar number of males and females captured (419 and 364, respectively). The capture of males and females did also not differ statistically for each mosquito genus and for *Cx. pipiens* as well. In addition, the relative abundance of each sex captured with W and UV light traps did not differ statistically. No statistically significant differences in the abundance of mosquitoes between different water types were found and the pattern was similar for every one of the genera tested alone and for *Cx. pipiens* (Table 3).

**Table 3.** Results of mosquito species captured throughout water type. The table shows both the total number of captures (N) and the abundance index relative to the number of sampling points per climatic region (M) and its associated standard error (SE) at the species level. Summarizing rows additionally show the number of species captured within each genus (within brackets).

Species	Stream		River		Lake	
	N	M (SE)	N	M (SE)	N	M (SE)
<i>An. spp.</i>	2	0.1 (0.04)	1	0.03 (0.03)	4	0.2 (0.1)
<i>An. algeriensis</i>	0	0.0 (0.0)	3	0.1 (0.1)	6	0.2 (0.1)
<i>An. claviger</i>	4	0.1 (0.1)	1	0.03 (0.03)	4	0.2 (0.1)
<i>An. maculipennis</i>	5	0.1 (0.1)	5	0.1 (0.1)	12	0.5 (0.4)
<i>An. marteri</i>	1	0.02 (0.02)	2	0.1 (0.1)	0	0.0 (0.0)
<i>An. plumbeus</i>	1	0.02 (0.02)	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)
<b>Total <i>An. spp.</i></b>	<b>13 (4)</b>	<b>0.3 (0.1)</b>	<b>12 (4)</b>	<b>0.3 (0.2)</b>	<b>26 (3)</b>	<b>1.0 (0.6)</b>
<i>Ae. spp.</i>	1	0.02 (0.02)	0	0.0 (0.0)	6	0.2 (0.2)
<i>Ae. vexans</i>	1	0.02 (0.02)	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)
<b>Total <i>Ae. spp.</i></b>	<b>2 (1)</b>	<b>0.04 (0.03)</b>	<b>0</b>	<b>0.0 (0.0)</b>	<b>6 (1)</b>	<b>0.2 (0.2)</b>
<i>Cx. spp.</i>	23	0.5 (0.2)	1	0.03 (0.03)	30	1.2 (1.0)
<i>Cx. pipiens</i>	75	1.6 (0.6)	151	4.1 (2.7)	280	10.8 (7.3)
<i>Cx. theileri</i>	16	0.4 (0.2)	6	0.2 (0.1)	33	1.3 (1.2)
<i>Cx. deserticola</i>	0	0.0 (0.0)	1	0.03 (0.03)	0	0.0 (0.0)
<i>Cx. univittatus</i>	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	1	0.04 (0.04)
<i>Cx. mimeticus</i>	0	0.0 (0.0)	2	0.1 (0.1)	4	0.2 (0.1)
<i>Cx. modestus</i>	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	1	0.04 (0.04)
<i>Cx. perexiguus</i>	2	0.04 (0.04)	1	0.03 (0.03)	1	0.04 (0.04)
<b>Total <i>Cx. spp.</i></b>	<b>116 (3)</b>	<b>2.5 (0.8)</b>	<b>162 (5)</b>	<b>4.4 (2.8)</b>	<b>350 (6)</b>	<b>13.5 (9.4)</b>
<i>Cs. spp.</i>	5	0.1 (0.1)	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)
<i>Cs. annulata</i>	16	0.4 (0.2)	13	0.4 (0.2)	14	0.5 (0.4)
<i>Cs. longiareolata</i>	1	0.02 (0.02)	0	0.0 (0.0)	2	0.1 (0.1)
<i>Cs. morsitans</i>	5	0.1 (0.1)	0	0.0 (0.0)	3	0.1 (0.1)
<i>Cs. subochrea</i>	4	0.1 (0.1)	1	0.03 (0.03)	25	1.0 (0.5)
<b>Total <i>Cs. spp.</i></b>	<b>31 (4)</b>	<b>0.7 (0.2)</b>	<b>14 (2)</b>	<b>0.4 (0.2)</b>	<b>44 (4)</b>	<b>1.7 (0.8)</b>
<i>O. caspius</i>	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)	4	0.2 (0.1)
<b>Total <i>O. spp.</i></b>	<b>0</b>	<b>0.0 (0.0)</b>	<b>0</b>	<b>0.0 (0.0)</b>	<b>4 (1)</b>	<b>0.2 (0.1)</b>
<i>U. unguiculata</i>	3	0.1 (0.1)	0	0.0 (0.0)	0	0.0 (0.0)
<b>Total <i>U. spp.</i></b>	<b>3 (1)</b>	<b>0.1 (0.1)</b>	<b>0</b>	<b>0.0 (0.0)</b>	<b>0</b>	<b>0.0 (0.0)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>165 (13)</b>	<b>3.6 (1.0)</b>	<b>188 (11)</b>	<b>5.1 (2.8)</b>	<b>430 (15)</b>	<b>16.5 (10.9)</b>

The final model for the global mosquito abundance showed statistically significant differences among climatic regions and sampling period (Table 4). The highest global abundance of mosquitoes was observed in climatic region 3 (Table 2 and Fig. 2) and in the summer-autumn 2010 sampling period (see Table 5). The highest abundances of *Culex* spp. in general and of *Cx. pipiens* in particular took place in climatic regions 3 and 4 and always in the period summer-autumn 2010 (Table 5). The highest number of species was observed in climatic regions 3 and 4 (Table 2).

**Table 4.** Statistics (F value, degrees of freedom (DF) and P-value) of the final models performed with the global abundance of mosquitoes, the abundance of *Culex* spp. and the abundance of *Cx. pipiens* as response variables.

Genus / Species	Variable	F	Num DF /Den DF	P-value
	<i>Intercept</i>	10.7	6/102	<0.001
All species	Sampling period	24.8	2/102	<0.001
	Climatic region	5.7	4/102	<0.001
	<i>Intercept</i>	7.9	6/102	<0.01
<i>Culex</i> spp.	Sampling period	17.6	2/102	<0.001
	Climatic region	5.1	4/102	<0.001
	<i>Intercept</i>	8.1	6/102	<0.001
<i>Cx. pipiens</i>	Sampling period	18.5	2/102	<0.001
	Climatic region	6.0	4/102	<0.001

## Discussion

This work is an approach to the distribution, abundance and community composition of mosquitoes potentially relevant in public and animal health in Mediterranean environments in inland Spain. The information obtained constitutes a robust basis for estimating potential risks of mosquito-borne disease emergence in continental

Mediterranean areas and consequently constitutes a key pillar for the prevention of future challenges regarding mosquito-borne diseases.

#### *Methodological considerations*

Our aim was to outline the populations of culicids in our study area and this was the reason for choosing the generic traps created by Sudia and Chamberlain (1988) at the CDC that allow capturing a wide range of species. Our results show that the use of light traps is adequate for collecting both males and females in similar proportions while the light type used does not have an evident effect on the capture ratio.

Due to logistic constraints our survey approach was limited to three visits per site (i.e., three capture nights per site), possibly limiting the estimated number and abundance of mosquitoes. This is just because of the fact that some species are active for short periods of time (Bueno Marí and Jiménez Peydró 2011) and hence may have been underestimated with our survey approach. However, the role of these species as vectors of diseases of public and animal health importance would be expected to be less relevant than that of multivoltine and, consequently, more abundant species because of their short activity period.

Finally, mosquito abundance was estimated in aquatic environments located in many different habitats of the study region, from the central cereal plains to mountainous areas. However, mosquitoes may be present in non-aquatic environments such as nearby animal farms and urban areas (Bueno-Marí and Jiménez-Peydró 2011) that were not surveyed.

#### *Distribution, abundance and composition of culicid populations*

Mosquito abundance and species number were both substantially higher in intermediately temperate and relatively dry climatic regions within the study area (Table



2). These regions are relatively flat areas in comparison to the other regions, which may favour the formation of optimal water reservoirs for mosquito breeding (see average runoff values in Table 1) and be responsible for the observed higher abundance and species number. In addition, rivers transport water fallen in the surrounding mountainous regions, constituting an additional water supply to flat regions that is not related to directly accumulated precipitation in the region. Mosquitoes were present in every sampled locality thus indicating a widespread distribution in the study area and the potential of mosquito-borne disease emergence in the region. However, this first approach shows the specific locations and climatic regions where future monitoring campaigns can be established for mosquito-borne disease surveillance.

Previous studies showed that *Cx. pipiens* is one of the most abundant and widely distributed mosquitoes in many European countries (Ruiz and Cáceres 2004; Bueno Marí et al. 2009; Bueno Marí and Jiménez Peydró 2011). *Cx. pipiens* was ten times more abundant than any other mosquito species captured in this study (Table 2). Several biological and behavioural traits of *Cx. pipiens* may underlie its higher abundance in the region: i) its environmental adaptability; ii) its host plasticity; and iii) the ability of females to produce more than one egg batch per year. *Cx. pipiens* is perfectly adapted to breed both in clean and polluted aquatic habitats and in rural and urban environments (Farajollahi et al. 2011), selecting from used tires to marshland shores for the development of immature stages. *Cx. pipiens* was present in rivers, lakes and streams (Table 3), supporting its known ubiquity and adaptability to different natural aquatic habitats. The host feeding preferences of North American and Spanish *Cx. pipiens* populations are highly similar, showing that nearly 80% feed on birds and the rest feed on mammals (Alcaide et al., 2009). Nonetheless, the preferences for particular hosts may be dependent on the hybridization rate between the two biotypes of the species:

*pipiens* and *molestus*. *Cx. pipiens* biotype *pipiens* feeds mainly on birds but its biotype *molestus* displays a preference for feeding on mammals (Kilpatrick et al. 2007), determining its high plasticity in host selection (Kilpatrick et al. 2006) and representing an important epidemiological trait for pathogen transmission between different host groups (Becker et al. 2010). Finally, *Cx. pipiens* is a multivoltine species, thus being able to produce several generations per year under favourable environmental conditions. The higher capture of *Cx. pipiens* in summer-autumn could be related to the particular extremely high precipitations in winter-to-summer 2010 (Hongoh et al. 2012); mean annual accumulated precipitation for the study region (AEMET 2011) in 2009 was less than 300mm while it exceeded 700 mm in 2010 with very wet winter (314 mm) and spring (163 mm) seasons. This agrees with the positive relationship observed between the accumulated precipitation in the 6 to 12 months previous to mosquito capture and the abundance of *Cx. pipiens* in the study region in a three-year fortnight mosquito survey (the authors, unpublished data). However, there is a great contrast between accumulated precipitation relating positively to *Cx. pipiens* abundance and the higher abundance found in the driest climatic region in our study area that deserves further research on the environmental factors conditioning *Cx. pipiens* life cycle at different geographic scales.

*Cx. theileri* was captured in association with *Cx. pipiens*, which may indicate similar environmental requirements. However, the higher reproductive performance of *Cx. pipiens* (Bueno Marí et al. 2009) may be an ecological advantage in comparison to *Cx. theileri*. In contrast to *Cx. pipiens*, *Cx. theileri* mainly feeds on mammals (Alcaide et al. 2009) but occasionally it parasitizes birds. The differing host preferences of *Cx. pipiens* and *Cx. theileri* may have a role in the epidemiology of pathogens transmitted by both of them, e.g. West Nile virus (Ramos et al. 1978). The abundance of *Cx. theileri*

in the study area contrasts with its low abundance in eastern coastal regions of peninsular Spain (Bueno-Marí and Jiménez-Peydró 2011) but is in the line with observations in rice fields from southern Spain (Ruiz and Cáceres 2004).

The third most abundant and distributed species in our study area was *Cs. annulata*, a multivoltine bird-feeding mosquito species. *Cs. annulata* is reported to be more abundant in northern than in southern Europe where it is replaced by *Cs. longiareolata* (Becker et al. 2010). However, the higher abundance of *Cs. annulata* in the region suggests that southern Mediterranean environments may be more favorable to *Cs. annulata* than expected.

*Cs. subochrea* is reported as a widely distributed but not abundant species in Europe (Becker et al. 2010). It is also scarce in Portugal and low abundant in coastal regions of Spain (Ribeiro et al. 1988) but it was fourth in abundance in our study area. Finally, the fifth most abundant mosquito was *An. maculipennis* complex, a complex of fourteen species of which only five have been described in Spain: *An. atroparvus*, *An. maculipennis* sensu stricto (ss), *An. labranchiae* currently extinct in Spain (Bueno-Marí and Jiménez-Peydró 2008) – *An. melanoon* and *An. subalpinus*. *An. atroparvus* is considered a coastal species but it may be present inland (Becker et al. 2010). In contrast, *An. maculipennis* ss is considered to be more resistant to continental dry climates than *An. atroparvus*. *An. maculipennis* ss is more abundant in inner rather than in coastal areas of the Iberian Peninsula where *An. atroparvus* predominates (Ruiz and Cáceres 2004), for which we expect *An. maculipennis* ss to be more abundant in CLM. However, both *An. maculipennis* ss and *An. atroparvus* seem to be similarly abundant in eastern coastal Spain and in mountainous environments (Bueno-Marí et al. 2009; Bueno-Marí and Jiménez-Peydró 2011).

The rest of species in the genus *Anopheles* present in CLM have been found also in low numbers in other Spanish regions (Ruiz and Cáceres 2004; Bueno-Marí and Jiménez- Peydró 2011) and, with the exception of *An. plumbeus*, also in Portugal (Ribeiro et al. 1988). The scarcity of species in the genus *Aedes* in our survey is in line with other Spanish surveys (Ruiz and Cáceres 2004; Bueno Marí and Jiménez Peydró 2011). The rest of *Culex* species found in CLM are scarce in other Spanish territories (Ruiz and Cáceres 2004; Bueno-Marí and Jiménez-Peydró 2011); with the exception of *Cx. modestus* and *Cx. mimeticus* in eastern Spain (Bueno-Marí et al. 2010; Bueno-Marí and Jiménez-Peydró 2011). In contrast to our findings, *Cs. longioaerolata* is abundant in eastern coastal regions of Spain and in mountain habitats (Bueno-Marí et al. 2009; Bueno-Marí and Jiménez-Peydró 2011), perhaps because larvae prefer fresh-water pools rather than natural permanent water bodies (Spencer et al. 2002; Becker et al. 2010). *Oc. caspius* is associated to salty marshes on the seaside and not expected to breed inland (Becker et al. 2010). Its highest abundances in Spain have been described in coastal regions (Ruiz and Cáceres 2004; Bueno-Marí et al., 2010; Bueno-Marí and Jiménez-Peydró, 2011). Finally, *Ur. unguiculata* is reported to be scarce in Spain (Ruiz and Cáceres 2004; Bueno-Marí and Jiménez-Peydró 2011) and Portugal (Ribeiro et al. 1988), which agrees with our observations.

#### *Public and animal health risks*

Fifteen of the 19 species found have a known role in disease transmission to humans and animals (Harbach 1988; Ribeiro et al. 1988; Rueda and Hernández 2008; Becker et al. 2010). There is no doubt that the higher risk of humans and animals getting infected by mosquito-borne pathogens in inland Spain is linked to pathogens in which *Cx. pipiens* is a known vector, such as WNV, Usutu virus (USUV) and RVF virus , among

others. The combination of stable populations of *Cx. pipiens* the main WNV and USUV vector (Bueno-Marí et al. 2010; Savage et al. 1999) and the high abundance and diversity of birds in wetlands in CLM (Pérez-Ramírez et al. 2010) the main WNV and USUV reservoirs may provide an opportunity for the increase in prevalence of both pathogens and the establishment of other infectious agents transmitted by *Cx. pipiens* as well. This is what recent studies seem to suggest after finding an apparently high distribution of flaviviruses in wild boar (*Sus scrofa*) in south-central Spain (Boadella et al. 2011 *In press*). Additionally, other species of mosquitoes present in CLM may be competent vectors of WNV and USUV (Vázquez et al. 2011), suggesting a highly complex epidemiology of these flaviviruses in the study region. *Cx. pipiens* is also involved in the transmission of the RVFV, which is currently considered as a serious threat for southern Europe (Turell et al. 1984). Several other of the culicid species captured can be vectors of other pathogens of public health relevance such as Tahyna and Sindbis virus (Reusken et al. 2010).

Mosquitoes of the genus *Anopheles* are the main vectors of human malaria (Schaffner et al. 2001), currently considered as one of the most important emerging diseases in the world (Becker et al. 2010). Malaria was endemic in peninsular Spain some 60 years ago and after that the epidemiological status of the country is known as anophelism without malaria (Bueno-Marí and Jiménez-Peydró 2008). The first autochthonous case of human malaria in Spain since it was eradicated was described recently (Peralta et al. 2010), showing the potential re-emergence of *P. vivax* in Spain.

The limited number of specimens captured and the need of concurrence of many factors for the establishment of an endemic cycle of malaria in a territory, suggest that CLM is at low risk. We have nonetheless to consider that the five species of *Anopheles* captured in CLM may be suitable vectors for *P. vivax* (Reusken et al. 2010).

It is quite difficult to predict when and where an outbreak of an exotic mosquito-borne disease is going to occur. It is however possible to establish the predisposition of certain areas to emerging diseases caused by both endemic and exotic vectors (Sutherst 1998). Thus, it is essential to know the composition and distribution of vectors and monitoring changes over time. Entomological surveillance is nowadays the strongest prophylactic medical weapon against vector-borne disease emergence.

### **Conclusions**

In summary, the study identified hot-spots of mosquito abundance and richness in the study area and showed the most abundant species. This allowed identifying that emergence of mosquito-borne diseases in the study region is almost limited to those transmitted by *Culex pipiens*, which accounted for more than the 60% of the mosquitoes in the study area. Hence, pathogens such as West Nile virus, Usutu virus, Rift Valley virus or Sindbis virus, among others, must be preferential for future research. The low abundance of mosquitoes of the genus *Anopheles* suggests that the risk of re-emergence of human malaria in inland Iberia is low although not negligible. This information would allow concentrating future research efforts on mosquito-borne pathogens and would provide a scientific base for policy makers for controlling mosquito-associated health risks.

### **Acknowledgements**

We acknowledge funding from “Junta de Comunidades de Castilla – La Mancha” and EU-FEDER (POII09-0141-8176) for this work. We also wish to thank João Teixeira, Lucia Verdicchio, Rocío Pinal and Sarah Delacour (University of Zaragoza) for their help with field and lab work. F. Ruiz-Fons was funded by Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and P. Acevedo was supported by the University of

Málaga and partially by the project CGL2009-11316/BOS– European Social Fund. The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- AEMET (2011) Agencia Estatal de Meteorología. Gobierno de España. <http://www.aemet.es>
- Alcaide M, Rico C, Ruiz S, Soriguer R, Muñoz J, Figuerola J (2009) Disentangling Vector-Borne Transmission Networks: A Universal DNA Barcoding Method to Identify Vertebrate Hosts from Arthropod Bloodmeals. *Plos One* 4(9)
- Aranda C, Eritja R, Roiz D (2006) First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Medical and Veterinary Entomology* 20(1):150-152
- Becker N, et al. (2010) Mosquitoes and their control, 2nd edn. Springer, Heidelberg
- Bueno-Marí R, Jiménez-Peydró (2008) Malaria en España: aspectos entomológicos y perspectivas de futuro. *Revista Española de Salud Pública* 82:467-489
- Bueno-Marí M, Moreno M, Oltra M, Jiménez-Peydró (2009) Artrópodos con interés vectorial en la salud pública en España. *Revista Española de Salud Pública* 83:201-214
- Bueno-Marí R, Chordá Olmos FA, Barnués-Bañeres A, Jiménez-Peydró R (2010) Detección de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) en Torrevieja (Alicante, España). *Boletín de la Asociación española de Entomología* 33:529-532
- Bueno-Marí R, Jiménez P (2011) Classification of Spanish Mosquitoes in Functional Groups. *Journal of the American Mosquito Control Association* 27:1-7
- Boadella M, Díez-Delgado I, Gutiérrez A, Höfle U, Gortázar C (2011) Do Wild Ungulates Allow Improved Monitoring of Flavivirus Circulation in Spain? *Vector-Borne and Zoonotic Diseases In press*
- Capelli G, et al. (2011) First report in Italy of the exotic mosquito species *Aedes* (Finlaya) *koreicus*, a potential vector of arboviruses and filariae. *Parasites and Vectors* 4:188
- Carles-Tolrá H (2002) Catálogo de los Díptera de España, Portugal y Andorra (Insecta). *Aragonesa SE*:45-47
- Collantes F, Delgado A (2011) Primera cita de *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Skuse, 1894) en la Región de Murcia. *Anales de Biología* 33:99-101
- Dalla Pozza G, Majori G (1992) First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *Journal of the American Mosquito Control Association* 8(3):318-320
- Delacour S, et al. (2009) *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Skuse, 1894) primera cita en Torrevieja (Alicante). *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa* 45:518
- El Mamy AB, et al. (2011) Unexpected Rift Valley fever outbreak, northern Mauritania. *Emerging Infectious Diseases* 17(10):1894-1896
- Encinas Grande A (1982) Taxonomía y Biología de los mosquitos del área salmantina (Diptera, *Culicidae*). Ediciones Universidad de Salamanca:437
- Estrada-Peña A, Jongejan F (1999) Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Experimental and Applied Acarology* 23(9):685-715
- Farajollahi A, Fonseca DM, Kramer LD, Kilpatrick AM (2011) "Bird biting" mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infection Genetics and Evolution* 11(7):1577-1585

- Gale P, et al. (2010) Assessing the impact of climate change on vector-borne viruses in the EU through the elicitation of expert opinion. *Epidemiology and Infection* 138(2):214-225
- Garcia-Bocanegra I, et al. (2011) Serosurvey of West Nile Virus and other Flaviviruses of the Japanese Encephalitis Antigenic Complex in Birds from Andalusia, Southern Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11(8):1107-1113
- Giménez B (1999) Madrid, Castilla – La Mancha. National Geographic Society, Barcelona
- Githeko A, Lindsay S, Confalonieri U, Patz J (2001) El cambio climático y las enfermedades transmitidas por vectores: un análisis regional. *Salud y medio ambiente. Boletín de la Organización Mundial de la Salud* 4:72-82
- Harbach RE (1988) The mosquitoes of the subgenus *Culex* in southeastern Asia and Egypt (Diptera: *Culicidae*). *Contributions of the American Entomological Institute* 24:1-240
- Hongoh L, Berrang-Ford ME, Scott LR (2012) Expanding geographical distribution of the mosquito, *Culex pipiens*, in Canada under climate change. *Applied Geography* 33:53–62
- Kilpatrick AM, Kramer LD, Jones MJ, Marra PP, Daszak P (2006) West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior. *Plos Biology* 4(4):606-610
- Kilpatrick AM, Kramer LD, Jones MJ, Marra PP, Daszak P, Fonseca DM (2007) Genetic influences on mosquito feeding behavior and the emergence of zoonotic pathogens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77(4):667-671
- Jenks G (1967) The data model concept in statistical mapping. *International Yearbook of Cartography* 7:186–190
- Landeg F (2007) Bluetongue outbreak in the UK. *Veterinary Record* 161(15):534-535
- Manguin S, Boëte C (2011) Global impact of mosquito biodiversity, human vector-borne diseases and environmental change. Lopez-Pujol J edn in *The importance of biological interactions in the study of biodiversity*. InTech Publication
- Mehlhorn H, et al. (2007) First occurrence of *Culicoides obsoletus*-transmitted Bluetongue virus epidemic in Central Europe. *Parasitology Research* 101(1):219-228
- Moutailler S, Krida G, Schaffner F, Vazeille M, Failloux A-B (2008) Potential Vectors of Rift Valley Fever Virus in the Mediterranean Region. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8(6):749-753
- Peralta PS, et al. (2010) First autochthonous malaria case due to *Plasmodium vivax* since eradication, Spain, October 2010. *Eurosurveillance* 15(41):2-4
- Purse BV, Mellor PS, Rogers DJ, Samuel AR, Mertens PP, Baylis M (2005) Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature Rev Microbiol* 3:175-181
- Ramos HC, Ribeiro H, Alves C, Antunes R (1978) Research on the mosquitoes of Portugal (Diptera, *Culicidae*) The mosquitoes of Algarve. *Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical* 5: 237-255
- Reusken C, De Vries A, Den Hartog W, Braks M, Scholte EJ (2010) A study of the circulation of West Nile virus in mosquitoes in a potential high-risk area for arbovirus circulation in the Netherlands, "De Oostvaardersplassen". *European Mosquito Bulletin* 28:69-83
- Ribeiro H, Ramos H, Pires C, Capela R (1988) An annotated checklist of the mosquitoes of continental Portugal (Diptera: *Culicidae*). Paper presented at the Congreso Ibérico Entomológico, Granada



- Roiz D, et al. (2007) A survey of mosquitoes breeding in used tires in Spain for the detection of imported potential vector species. *Journal of Vector Ecology* 32(1):10-15
- Rosenberg R, Ben Beard C (2011) Vector-borne Infections. *Emerging Infectious Diseases* 17(5):769-770
- Rueda SJ, Hernández VR (2008) Contribución al conocimiento de los Culicidos del municipio de Torreblanca (Castellón, España) (Diptera: *Culicidae*). *Boletín de la Asociación Española Entomológica* 32:315-325
- Ruiz-Fons F, Reyes-García AR, Alcaide V, Gortázar C (2008) Spatial and temporal evolution of bluetongue virus in wild ruminants, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 14(6):951-953
- Ruiz S, Caceres F (2004) Technical basis for the control of *Culicidae* mosquitoes in the rice fields of "la janda", Cadiz (S.W. Spain). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 30(4):753-762
- Savage HM, et al. (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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61(4):600-611
- Schaffner F, Angel G, Geoffroy B, Hervy JP, Rhaïem A, Brunhes J (2001) The Mosquitoes of Europe / Les Moustiques d'Europe: An Identification and Training Programme. IRD Éditions and EID Méditerranée, Montpellier CD-rom
- Shin EH, Lee WJ, Lee HI, Lee DK, Klein TA (2005) Seasonal population density and daily survival of anopheline mosquitoes (Diptera: *Culicidae*) in a malaria endemic area, Republic of Korea. *Journal of Vector Ecology* 30(1):33-40
- Sudia WD, Chamberlain RW (1962) Battery-operated light trap, an improved model. *Mosquito News Albany NY* 22:126-129
- Sutherst RW (1998) Implications of global change and climate variability for vectorborne diseases: generic approaches to impact assessments. *International Journal for Parasitology* 28(6):935-945
- Spencer M, Blaustein L, Cohen JE (2002) Oviposition habitat selection by mosquitoes (*Culiseta longiareolata*) and consequences for population size. *Ecology* 83(3):669-679
- Turell MJ, Gargan TP, Bailey CL (1984) Replication and dissemination of Rift Valley fever virus in *Culex pipiens*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 33(1):176-181
- Vazquez A, et al. (2011) Short Report: West Nile and Usutu Viruses in Mosquitoes in Spain, 2008-2009. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85(1):178-181
- Weissenboeck H, Hubalek Z, Bakonyi T, Nowotny N (2010) Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: Worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Veterinary Microbiology* 140(3-4):271-280
- WHO (2008) World Malaria Global Malaria Programm. WHO 246



# Capítulo 2

---



## **Ecogeographical factors of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in inner continental Mediterranean Iberia**

Mauricio Durán-Martínez, Pelayo Acevedo, Javier Lucientes, Christian Gortázar,

Francisco Ruiz-Fons

(En preparación)



---

**Factores ecogeográficos determinantes de la abundancia de *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) en zonas continentales mediterráneas de la península ibérica****Resumen**

Tras identificar que *Culex pipiens* es la especie de mosquito con mayor relevancia en el centro-sur de España desde el punto de vista de la salud pública y la sanidad animal debido a su gran distribución y abundancia, se planteó identificar los factores ecogeográficos que modulan la abundancia de esta especie en zonas no urbanas. Para ello, se tomaron datos de treinta y tres variables ecogeográficas agrupadas en tres factores (geografía, clima y hospedadores) de cada una de las treinta y nueve localidades en las que la abundancia de *Cx. pipiens* se estimó en tres periodos en 2009 y 2010. Se desarrollaron modelos estadísticos para averiguar la influencia de estas variables ecogeográficas sobre la abundancia de *Cx. pipiens*, para lo cual la abundancia de esta especie – medida como el número de individuos capturados por periodo de muestreo – a nivel de localidad se empleó como variable dependiente. La región climática junto con el periodo de muestreo y la densidad de rumiantes domésticos y seres humanos fueron las variables estadísticamente relacionadas con la abundancia de *Cx. pipiens* en la zona de estudio. Así, es esperable que la abundancia de esta especie de mosquito sea más elevada en ambientes acuáticos de regiones climáticas medianamente templadas que presenten una adecuada densidad de rumiantes domésticos y de población humana en contraste con regiones climáticas montañosas, más frías y menos pobladas del área de estudio. Las variables identificadas serán además responsables de modular los riesgos de ser infectado por patógenos transmitidos por *Cx. pipiens* a los que animales y personas están expuestos ya que la prevalencia depende en gran medida de la abundancia del vector.

**Abstract**

*Culex pipiens* is the most abundant and widespread mosquito species in south-central Spain and consequently the most relevant one from an animal and public health perspective. We aimed to identify ecogeographical factors modulating *Cx. pipiens* population dynamics in non-urban sites. Thirty-three ecogeographical predictors grouped in three factors (geography, climate and hosts) were gathered for each of the 39 study locations where *Cx. pipiens* abundance was recorded in three periods in 2009 and 2010. Spatially explicit modeling was performed to ascertain the influence of the predictors on *Cx. pipiens* abundance – measured as the number of captured individuals per sampling site and sampling period. Climatic region – a regionalization of the study area according to climatic parameters – together with sampling period – related to phenology – and domestic ruminant and human population densities were statistically related to the abundance of *Cx. pipiens*. *Cx. pipiens* abundance in the study area would be expected to be higher in aquatic environments of intermediately warm regions where availability of domestic ruminant and human hosts is guaranteed in contrast to colder, lowly populated mountainous regions. Identified factors modulate the risk of animals and humans to get infected by pathogens transmitted by *Cx. pipiens*.

## Introduction

Populations of arthropod vectors constantly fluctuate in density. Density fluctuation at small geographic scales is regulated by seasonal meteorological variations in temperature and moisture and by changes in food resources – i.e. availability of hosts – that drive the emergence of new broods of adults (Ruiz-Fons and Gilbert 2010; Ruiz-Fons et al. 2012). Understanding ecological and geographical drivers of vector population dynamics is essential to understand their role in the ecology of vector-borne pathogens (Higgs et al. 2004) and to prevent outbreaks of vector-borne diseases (Becker et al. 2010).

Mosquitoes (Diptera: *Culicidae*) constitute the main source of vector-borne diseases for humans and are second to ticks in the transmission of diseases to animals (Sonenshine et al. 2002). Worldwide, the most studied mosquito species is the *Culex pipiens* complex, a group of morphologically and evolutionarily close subspecies – including *Cx. p. pipiens*, *Cx. p. quinquefasciatus* and *Cx. p. australicus* (Harbach 2011) – that may also be subdivided in races and biotypes (Vinogradova 2000; Fonseca et al. 2004; Becker et al. 2010). *Cx. pipiens* complex species cannot be easily differentiated by morphology because of the lack of distinct morphological characteristics and the presence of hybrids (Zhao and Lu 1999; Vinogradova 2000) and only molecular techniques allow the correct differentiation between them (Miller et al. 1996; Kent et al. 2007). *Cx. pipiens* is worldwide distributed; *Cx. p. pipiens* is mainly present in temperate climatic regions of the world while *Cx. p. quinquefasciatus* occupies tropical regions (Savage 2006). Female *Cx. pipiens* lay egg batches in stagnant water of both clean and polluted aquatic habitats, selecting from used tires to marshland shores (Farajollahi et al. 2011). This confers *Cx. pipiens* the ability to breed in widely different habitats in a broad diversity of climatic regions. *Cx. pipiens* does not produce

desiccation resistant eggs and hence the presence of surface water is a limiting factor (Becker et al. 2010). Females are attracted by the odour generated from organic matter in water such as ammonia and carbon dioxide (Becker 1989) because this ensures nutrient availability for the development of immature stages. Therefore, sites with permanent water movement are avoided, although they can breed in slow water sites within rivers or streams.

*Cx. pipiens* may produce up to 6 different generations per year in temperate climates and developmental periods range from 7 to 28 days depending on temperature and food availability (Becker et al. 2010). Temperature does not only regulate development but also survival. Overwintering is a common trait of *Cx. pipiens* in temperate climates (Becker et al. 2010), allowing a quick establishment of next year's first generation and consequently conditioning abundance during its seasonal activity period in the year. To overwinter, adults in the last annual generation of *Cx. pipiens* (i.e. adults emerged in autumn) save body fat by feeding on carbohydrates from plants (Becker et al. 2010). As temperatures drop off in the autumn, adult mosquitoes find refuge in culverts, basements and protected areas and decrease their metabolism. Winter severity greatly conditions survival of overwintering arthropod vector stages (Ciota et al. 2011; Ruiz-Fons et al. 2012) and hence may greatly condition abundance the next year.

*Cx. pipiens* complex is considered the most important vector of West Nile virus (WNV) and Saint Louis Encephalitis virus (SLEV) in North America (Kilpatrick et al. 2005; Pesko and Mores 2009). In other places of the world *Cx. pipiens* can vector a wide array of pathogens including Rift Valley fever virus (RVFV; Turell et al. 1984), Japanese encephalitis viruses (JEV; Weng et al. 2000), Usutu virus (USUV; Busquets et al. 2008), Sindbis virus (SIV; Hesson et al. 2011), *Plasmodium* spp. causing avian



malaria (Kimura et al. 2010) and filarial worms such as *Wuchereria bancrofti* (Bogh et al. 1998) and *Dirofilaria immitis* (Yildirim et al. 2011). In Europe *Cx. pipiens* has been recently linked to outbreaks of WNV (Hayes et al. 2005). WNV is currently considered as an emerging threat to both animal and public health in southern Europe, as recent cases in Spain and Italy suggest (Figuerola et al. 2007; Veronesi et al. 2012). Additionally, WNV or evidence of its presence have been reported in Spanish wildlife even in inland regions (Höfle et al. 2008; Gutierrez-Guzmán et al. 2012), indicating that determining environmental factors driving *Cx. pipiens* abundance – the most abundant culicid vector in south-central Spain (the authors, unpublished) – is paramount to reduce risks of WNV and other transmitted pathogens in inland Spain. The aim of this study was to improve knowledge on the ecogeographical factors modulating *Cx. pipiens* population dynamics in continental Mediterranean areas of the Iberian Peninsula.

## **Material y Methods**

### *Study area and sampling site selection criteria*

Castilla - La Mancha (CLM) is located in south-central Spain and constitutes 15.7% of mainland Spain. The region is a broad plateau (altitudes from 600 to 1,000 m) surrounded by different mountain ranges. CLM is dominated by a continental Mediterranean climate with extreme temperature (cold winters and very hot summers) and rainfall ranges (300-700 mm) with large seasonal contrasts (Giménez 1999). Climatic conditions are variable in CLM. Thus, the main climatic regions in CLM were identified to stratify the survey according to regional macroclimatic variations. For this, 27 climatic and spatial variables (Table 1) were gathered for the 905 UTM 10x10 km squares in CLM and a Principal Component Analysis (PCA) was performed over these

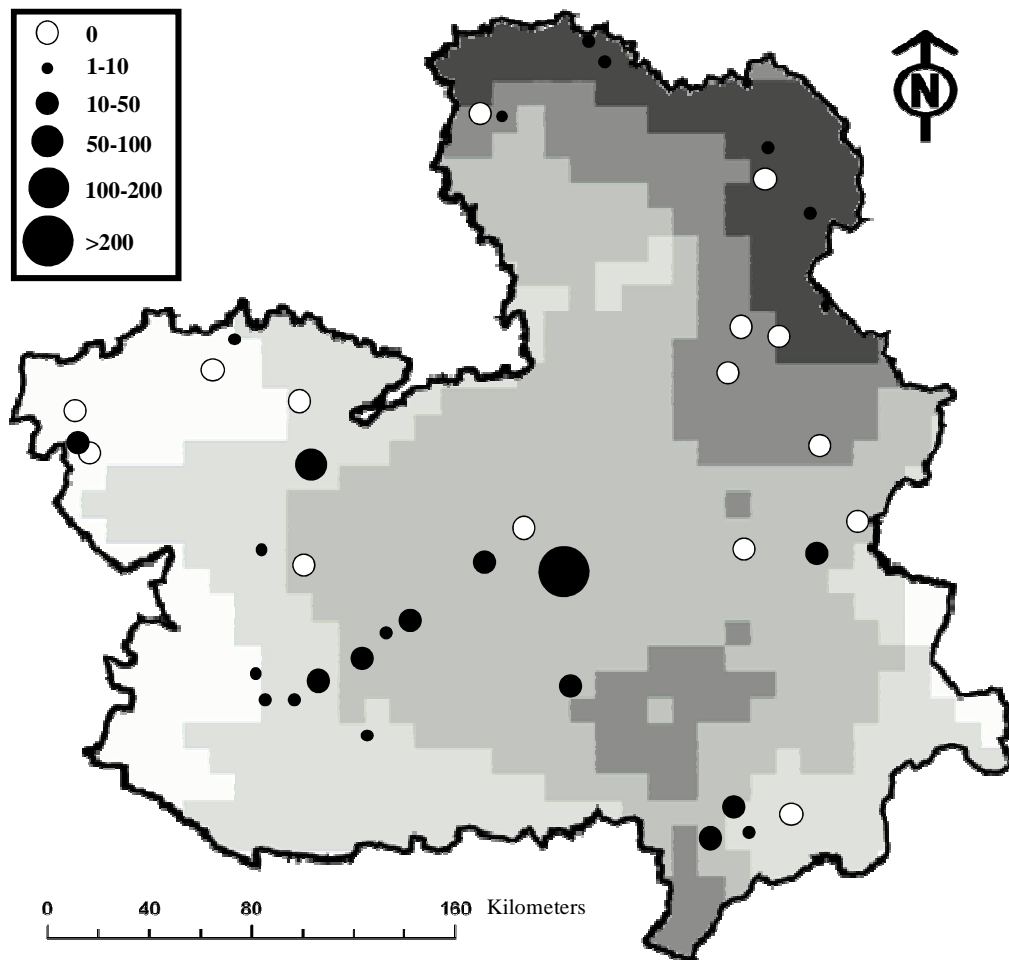
variables. Later on, the first factor in the PCA was used to climatically regionalize CLM by classifying them through the Jenks Natural Breaks Classification method (Jenks 1967). This method reduces variance within classes while it maximizes variance between classes in continuous data. According to this classification, CLM was divided into five climatic regions that were considered for sampling site selection (Fig. 1). From each region, a number of 10x10 UTM squares were selected from those with permanent water bodies (i.e. rivers, lagoons or streams). From every selected square the specific sampling site was selected to be close to permanent water sources – reservoir lakes, rivers and ponds along water streams. Sampling site selection was performed from the standpoint of their favourability for mosquito breeding based on literature review (e.g., Becker et al. 2010).

#### *Mosquito survey*

The survey for estimating the abundance of *Cx. pipiens* took place in three different periods of 2009 and 2010: autumn (Oct-Nov), spring-summer (May-July) and summer-autumn (Aug-Sep), avoiding winter time when activity is reduced. The survey was carried out by placing a trap station in each of the sampling sites. Trap stations were formed by three Centers for Disease Control (CDC) light traps, two of them equipped with a white lamp and the other one with a black light lamp, separated 20 m one from each other. Traps were hung from a horizontal structure to allow the light source to remain at a height of 1.5 m from the ground (Shin et al. 2005). Trapping was carried out from 8:00 pm to 8:00 am during one night per site and period. Captured mosquitoes were sexed, taxonomically identified and quantified (Schaffner et al. 2001; Becker et al. 2010).

**Table 1.** Environmental variables gathered for each of the 905 10x10 km UTM squares of the study region and their relation with the first factor obtained from the principal component analysis (PCA). The mean value of every variable at each climatic region obtained with the PCA factor (see text and Figure 1) and its associated standard error (within brackets) are also shown.

Variable	Factor	Bioclimatic region				
		1	2	3	4	5
Longitude (m) <sup>1</sup>	-0.321	56.5 (0.6)	55. (0.3)6	52.1 (0.3)	47.1 (0.7)	38.9 (0.9)
Latitude (m) <sup>1</sup>	-0.652	452.0 (0.4)	441.2 (0.9)	437.4 (0.4)	433.9 (0.5)	435.9 (0.6)
Difference in altitude (m)	-0.407	368.2 (20.1)	331.5 (16.7)	198.6 (9.4)	317.2 (12.4)	293.2 (12.4)
Mean annual no. of days with hail <sup>2</sup>	-0.518	4.3 (0.2)	3.5 (0.1)	2.9 (0.1)	2.4 (0.1)	2.9 (0.1)
Mean annual no. of frost days <sup>2</sup>	-0.760	105.3 (0.7)	79.5 (1.1)	69.5 (0.4)	51.1 (0.9)	36.8 (0.6)
Mean annual no. of days with precipitation >0.1mm <sup>2</sup>	-0.599	79.0 (1.9)	70.1 (1.2)	61.8 (0.5)	58.1 (0.9)	61.1 (0.8)
Mean annual no. of foggy days <sup>2</sup>	-0.792	18.0 (0.7)	12.4 (0.6)	4.2 (0.1)	2.0 (0.1)	1.1 (0.1)
Runoff (mm)	-0.484	158.9 (13.1)	148.1 (8.8)	60.4 (4.4)	77.8 (5.8)	154.0 (10.9)
Average annual potential evapotranspiration (mm) <sup>2</sup>	0.856	654.0 (2.8)	733.5 (3.9)	786.7 (2.0)	818.5 (2.2)	850.2 (3.6)
Average annual actual evapotranspiration (mm)	-0.549	573.3 (8.2)	595.8 (8.7)	461.3 (4.9)	467.0 (6.5)	609.4 (10.5)
Mean relative air humidity in January (HUJ; %) <sup>2</sup>	0.424	87.0 (0.2)	88.2 (0.2)	90.4 (0.1)	88.6 (0.2)	89.3 (0.3)
Mean relative air humidity in July (HUJU; %) <sup>2</sup>	-0.534	70.6 (0.3)	65.5 (0.5)	63.2 (0.2)	62.2 (0.3)	62.7 (0.6)
Continentality index <sup>2, 3</sup>	0.235	21.6 (0.9)	26.1 (0.8)	29.0 (0.5)	29.1 (0.6)	28.5 (0.7)
Moisture Index <sup>2, 4</sup>	-0.593	88.3 (3.2)	73.1 (2.6)	56.2 (1.1)	52.4 (1.4)	62.5 (2.0)
Mean annual insolation (hours year <sup>-1</sup> ) <sup>2, 5</sup>	0.857	24.8 (0.1)	27.5 (0.1)	28.9 (0.0)	28.7 (0.0)	29.3 (6.9)
Rainfall regularity	0.286	28.7 (0.2)	30.9 (0.2)	30.9 (0.1)	30.8 (0.1)	30.0 (0.1)
Slope (degrees)	-0.444	3.0 (0.2)	2.8 (0.2)	1.5 (0.1)	2.4 (0.1)	2.3 (0.1)
Soil permeability	0.066	2.4 (0.1)	2.5 (0.1)	2.5 (0.0)	2.0 (0.1)	2.0 (0.1)
Average annual accumulated precipitation (P; mm) <sup>2</sup>	-0.647	684.1 (22.6)	621.8 (12.3)	464.0 (5.7)	473.4 (8.6)	621.1 (13.1)
Average annual maximum precipitation in 24 hours (PM24; mm) <sup>2</sup>	0.123	93.4 (1.9)	100.9 (2.3)	102.3 (1.6)	134.8 (2.8)	151.5 (4.8)
Average annual relative maximum precipitation (P/PM24)	0.460	0.1 (0.0)	0.2 (0.0)	0.2 (0.0)	0.3 (0.0)	0.3 (0.0)
Average annual solar radiation (Kwh m <sup>-2</sup> day <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	0.731	441.2 (1.4)	471.3 (1.4)	479.3 (0.5)	476.7 (0.5)	472.1 (0.6)
Mean temperature in January (TEJ; °C) <sup>2</sup>	0.876	0.8 (0.1)	3.3 (0.1)	4.5 (0.0)	5.3 (0.1)	6.1 (0.1)
Mean temperature in July (TEJU; °C) <sup>2</sup>	0.909	19.7 (0.1)	21.8 (0.1)	24.0 (0.1)	24.5 (0.1)	25.3 (0.1)
Average annual mean temperature (°C) <sup>2</sup>	0.906	9.5 (0.1)	11.7 (0.1)	13.5 (0.1)	14.2 (0.1)	14.9 (0.1)
Average annual air humidity range (HUJ-HUJU; %)	0.715	16.4 (0.3)	22.7 (0.5)	27.2 (0.2)	26.5 (0.2)	26.6 (0.5)
Average annual temperature range (TEJU-TEJ; %)	0.354	18.9 (0.1)	18.6 (0.1)	19.5 (0.1)	19.2 (0.1)	19.1 (0.1)



**Figure 1.** Map of the study region showing the geographic distribution and the abundance of *Culex pipiens* in the study region. Climatic regions 1 to 5 are represented by decreasing intensity in grey colour within the map (from dark grey for region 1 to white for region 5).

### *Ecogeographical variables*

A series of ecogeographical variables (Table 2) were gathered for the study sites in order to search for environmental drivers of *Cx. pipiens* abundance. Selection of variables was based on information obtained from previous studies on the ecology of *Cx. pipiens* (Becker et al. 2010) and on the availability of these variables at the study scale.

First, geographic variables were considered as potential environmental drivers of *Cx. pipiens* abundance. Spatial location – geographical longitude and latitude – of each sampling point was obtained with portable GPS devices because *Cx. pipiens* abundance in a particular site may be spatially structured (Legendre 1993).

Meteorological data regarding temperature, rainfall, humidity and wind from 152 meteorological stations in CLM were provided by the Spanish Meteorological Agency (AEMET 2011). Data from the geographically closest meteorological station were employed to climatically characterize sampling sites. Data were used to calculate meteorological variables that could potentially drive the abundance of *Cx. pipiens* by modulating developmental rates, activity and survival. Temperature is a major driver of the time taken by the different developmental stages of *Cx. pipiens* to be completed during the appropriate climatic window for *Cx. pipiens* development (Gillespie and Belton 1980; Higgs et al. 2004). It also determines setting up and duration of diapause periods (Brust and Costello 1969). Temperature in addition to air moisture and wind speed also modulates the activity of individuals during the capture time, thus conditioning abundance estimates (Ruiz-Fons and Gilbert 2010). Temperature, especially winter temperature, greatly conditions arthropod survival too, conditioning abundance in a particular site. Activity and survival of mosquitoes is also driven by hydric stress (Clements 1963). Measuring the hydric stress experienced by mosquitoes allows controlling bias in abundance estimates due to the influence of water loss on mosquito activity and survival (Clements 1963; Chapman 1982). Vapour pressure deficit (VPD) calculated with temperature and relative air humidity data was considered as a measure of hydric stress since VPD is linearly related to the evapotranspiration rate. VPD was calculated as the difference between water vapour saturation pressure (VSP)

and water vapour pressure (VP). VSP was calculated according to the Keenan and Keyes formula (<http://ecaaser3.ecaa.ntu.edu.tw/weifang/ebook/psy-data1998.pdf>):

$$\ln(VSP/R) = \frac{A + BT + CT^2 + DT^3 + ET}{FT + GT^2}$$

where  $R=22105649.25$ ,  $A=-27405.526$ ,  $B=97.5413$ ,  $C=-0.146244$ ,  $D=0.12558 \times 10^{-3}$ ,  $E=-0.48502 \times 10^{-7}$ ,  $F=4.34903$ ,  $G=0.39381 \times 10^{-2}$  and  $T$  is temperature in K. VP was calculated as:

$$VP = \frac{VSP \times RH}{100}$$

where RH is the relative humidity in percentage. Rainfall was considered as a measure of the probability of generation of environmentally favourable sites for mosquito breeding as surface water is essential for *Cx. pipiens* reproduction. As rainfall accumulated in different interval periods before sampling could have different effects on mosquito development, survival and activity, different temporal measures of rainfall were considered for analysis (Table 2). Climatic region was considered as a measure of spatial variation in environmental conditions while altitude – recorded with portable GPS devices – was included as an indirect measure of climatic variation due to variations in altitude within similar climatic sites.

**Table 2.** Relationship between biogeographical variables in each of the three factors considered for statistical analyses and the abundance of *Culex pipiens*. The Spearman correlation coefficient ( $\rho$  – continuous predictors) or the chi-square value ( $\chi^2$  – categorical predictors), the significance value ( $p$ ), the arithmetic mean and its associated standard error as well as value ranges for continuous predictor variables are shown. Variables that were selected for multivariate modelling are marked with an asterisk.

Factor	Variable code	Variable description	$\rho/\chi^2$	$p$	Mean (SE)	Range
Geography	Lo*	Longitude (m/10 <sup>3</sup> )	-0.204	0.037	482.5 (8.7)	314.1-627.6
	La*	Latitude (m/10 <sup>4</sup> )	-0.195	0.048	439.2 (0.9)	425.2-456.6
Climate	Alt	Altitude (m)	-0.237	0.016	743.0 (24.8)	324.0-1416.0
	Cr*	Climatic region (categorical)	8.347	0.080	---	---
	T*	Mean temperature of sampling day (°C)	0.313	0.001	17.4 (0.5)	2.6-29.0
	Tm	Average mean temperature 30 days bs (°C)	0.295	0.002	18.8 (0.4)	11.9-28.6
	Ts	Average mean temperature 180 days bs (°C)	0.092	0.353	16.1 (0.6)	6.1-25.5
	Tan*	Average mean temperature 365 days bs (°C)	0.282	0.004	14.6 (0.2)	10.2-16.7
	Tw	Average winter mean temperature (°C)	0.233	0.018	6.1 (0.2)	2.9-8.4
	Pm*	Accumulated precipitation in 30 days bs (mm)	-0.141	0.154	39.4 (2.0)	4.3-90.3
	Pt	Accumulated precipitation in 90 days bs (mm)	-0.067	0.499	127.7 (8.0)	13.4-339.4
	Ps	Accumulated precipitation in 180 days bs (mm)	0.010	0.920	309.1 (18.7)	52.1-768.5
	Pan*	Accumulated precipitation in 365 days bs (mm)	0.180	0.067	593.8 (19.0)	281.3-1123.6
	RH	Mean relative humidity of the sampling day (%)	-0.294	0.002	59.2 (1.2)	32.5-92.5
	RHm	Average relative humidity of 30 days bs (%)	-0.222	0.023	57.3 (1.2)	13.0-86.0
	VSD	Water vapour saturation deficit (mm)	0.368	0.001	878.1 (44.2)	105.1-2321.3
	VSDm*	Water vapour saturation deficit for 30 days bs (mm)	0.307	0.002	1037.9 (50.8)	237.0-2578.8
Ws*	Average wind speed of the sampling day (Km/h)	-0.191	0.052	5.5 (0.4)	0.0-22.2	
Hosts	Rd_fav	Favourability for red deer	-0.041	0.676	0.617 (0.017)	0.270-0.889
	Rod_fav	Favourability for roe deer	-0.209	0.033	0.473 (0.022)	0.087-0.928
	Wb_fav	Favourability for wild boar	-0.211	0.032	0.505 (0.017)	0.125-0.758
	Wu_fav*	Favourability for wild ungulates	-0.210	0.033	0.532 (0.014)	0.265-0.795
	Do	Density of sheep in the municipality (No./Ha)	0.090	0.361	1.191 (0.590)	0.000-35.941
	Db	Density of cattle in the municipality (No./Ha)	0.039	0.695	0.184 (0.047)	0.000-2.173
	Dc	Density of goats in the municipality (No./Ha)	0.168	0.087	0.081 (0.030)	0.000-1.780
	Do_f	Density of sheep farms in the municipality (No./Ha)	0.072	0.470	0.012 (0.096)	0.000-1.000
	Db_f	Density of cattle farms in the municipality (No./Ha)	0.047	0.638	0.001 (0.000)	0.000-0.014
	Dc_f	Density of goat farms in the municipality (No./Ha)	0.161	0.103	0.002 (0.000)	0.000-0.003
	Drum	Density of ruminants in the municipality (No./Ha)	0.113	0.254	1.457 (0.626)	0.000-38.169
	Drum_f*	Density of ruminant farms in the municipality (No./Ha)	0.123	0.213	0.004 (0.001)	0.000-0.087
	Dt*	Distance to the nearest town (Km)	-0.162	0.099	2.49 (0.29)	0.00-11.80
	Pd*	Human population density in the municipality (No./Km <sup>2</sup> )	0.195	0.047	40.08 (7.53)	0.71-358.90

Finally, hosts are deemed to be responsible for high variations in blood-feeding arthropod abundance (Ruiz-Fons and Gilbert 2010; Muñoz et al. 2011). It is expected that areas with high concentration of hosts would favour reproduction, thus increasing abundance of mosquitoes. We could not gather abundance data on wild bird populations in the study sites. However, the availability of mammals can significantly influence the abundance of mosquitoes in particular areas (Muñoz et al. 2011). Thus, we used information on the abundance of wild and domestic ungulates and humans. The number of cattle, sheep and goats and the number of farms in CLM in 2007 at the municipality level were provided by the regional animal health authorities. Data allowed calculating the density of each ruminant species and farms per hectare in each municipality. The availability of the most frequent wild ungulate hosts (red deer – *Cervus elaphus*, roe deer – *Capreolus capreolus* - and Eurasian wild boar – *Sus scrofa*) was estimated on the basis of their environmental favourability which was produced in the context of an epidemiological study focused on *Culicoides imicola* abundance (details in Acevedo et al. 2010). Finally, the availability of human hosts was measured as the population density at the municipality level – inhabitants per square kilometre – according to demographic statistics obtained from the Spanish National Statistics Institute (INE 2011). An additional proxy of human availability was measured by the distance from the sampling point to the nearest town.

### *Statistical analyses*

Statistical models were performed over the abundance of *Cx. pipiens* at a particular site in a particular sampling period with different predictor variables (Table 2). However, as predictor variables may be highly correlated, their inclusion at a time in multivariate analyses could show confounding results due to multicollinearity. To avoid



multicollinearity, the correlation matrix of variables within the geographic and climatic factors was constructed. Later on, the bivariate relationship of any of the predictors with the response variable was assessed through Spearman correlations for continuous predictors and Mann-Whitney U tests for categorical predictors. Variable selection for multivariate analysis was performed over each set of highly correlated variables according to their relationship with the response variable measured by the correlation coefficient and the significance value (Table 2). When highly correlated predictors ( $\rho > 0.5$ ) were statistically linked to the response variable ( $p < 0.05$ ), only the most meaningful predictor was included in the next stage (Table 2). Given the overdispersion of *Cx. pipiens* abundance data, for modelling purposes we used generalized linear mixed models with negative binomial distribution and logarithmic link function. Control of pseudoreplication effect was done by introducing location as a random variable in the modelling approach. To select the best model explaining variance in *Cx. pipiens* abundance we used a forward stepwise model-selection procedure. The bivariate relationship of selected predictors with the response variable was assessed by performing univariate models and relationships considered for significance in addition to multivariate analysis. All steps were assessed to obtain a decrease in the Akaike Information Criterion (AIC; Akaike 1974). Modelling stopped when no decrease in the AIC was observed. Further details of the analytical procedure were included in Ruiz-Fons et al. (2008). The coefficient of each co-variable included in the selected model was expressed as an incidence rate ratio (IRR). Statistical analyses were carried out with the IBM-SPSS 19.0 Statistical Package software (IBM. Corporation. New York. USA).

## Results

Globally, 506 individuals of *Cx. pipiens* were captured during the survey. Of those, 335 were males and 171 were females. Mean capture was higher in intermediate temperate climatic regions within CLM when compared to colder and warmer regions (Fig. 1).

### *Univariate analyses*

Results from bivariate relationships between ecogeographical predictors and *Cx. pipiens* abundance showed that many of the variables – mainly climatic and host variables – were statistically correlated with *Cx. pipiens* abundance (Table 2). Temperature variables at different temporal scales showed all a significant positive effect on the abundance of *Cx. pipiens*. Moisture related variables were also statistically related to abundance of *Cx. pipiens* although surprisingly showing that lower air relative humidity values in the sampling day favoured abundance, which was caused by higher abundances during the warmest months in the year. This was confirmed by the positive effect of VPD on abundance (Table 3). Finally, relationships between host abundance and *Cx. pipiens* abundance were statistically significant but with contrasting influences of wild and domestic ungulates. While environmental favourability for roe deer was negatively correlated with *Cx. pipiens* abundance, density of sheep farms was positively related (Table 3).

**Table 3.** Results of the final statistical model for the abundance of *Culex pipiens* (individuals x trap station<sup>-1</sup> x night<sup>-1</sup>) showing the incidence rate ratio (IRR), its associated standard error (SE) and the significance value (p) for each of the variables included in the model. Abbreviations are drawn according to Table 2.

Variable	IRR	SE	p
<i>Intercept</i>	$6.54 \times 10^{-4}$	$346.42 \times 10^4$	0.628
<i>Climate region</i>			
Region 1	2.82	3.98	0.454
Region 2	-0.52	3.08	0.570
Region 3	6.69	1.85	<0.01
Region 4	Ref		
Region 5	1.02	2.00	0.979
<i>Sampling period</i>			
Autumn	-0.26	1.79	<0.05
Spring-Summer	-0.31	1.60	<0.05
Summer-Autumn	Ref		
Drum_f	$8.26 \times 10^{12}$	$95.64 \times 10^4$	<0.05
Pd	1.01	1.00	<0.001
Wu_fav	13.68	7.87	0.208
Tan	1.46	1.27	0.113
T	1.07	1.05	0.158
Dt	-0.87	1.08	0.100

### *Multivariate modelling*

The selected model showed the influence of climatic region on the abundance of *Cx. pipiens*, which agreed with its higher abundance in climatic region 3 with respect to the rest of the regions (Fig. 1). Higher abundances were obtained during the survey carried out in summer-autumn 2010 and this was evidenced in final model results, showing that abundances at the end of summer are significantly higher than in spring-summer and autumn periods (Table 3). Interestingly, the final model showed a statistically

significant positive influence of domestic ruminant density in the municipality where the survey was carried out and also a positive effect of human population density (Table 3).

## **Discussion**

Modelling *Cx. pipiens* abundance with different ecogeographical variables allowed us to identify factors that would partly modulate the risks of animals and humans to get infected by pathogens transmitted by this mosquito species, such as WNV, USUV, SIV, RVFV or *D. inmitis*. Results highlighted that abundance of this important species in the study area would be expected to be higher in aquatic environments of intermediately warm regions where availability of domestic ruminant and human hosts is guaranteed in contrast to lowly populated warmer and colder regions.

### *Methodological considerations*

We have to acknowledge the influence of particular microhabitat conditions of the study sites on *Cx. pipiens* abundance that could not be controlled in our analysis such as nutrient concentration, composition of the vegetation community in reproduction sites, abundance of predators or stochastic events such as heavy rain episodes reducing nutrients from potential reproduction sites.

### *Environmental drivers of *Cx. pipiens* abundance*

*Cx. pipiens* is an ubiquitous mosquito species that is able to occupy a wide range of climatic regions. However, *Cx. pipiens* was more abundant in temperate climatic regions within the study area, thus showing that although adapted to inhabit in cold temperate areas (Weitzel et al. 2011), it would be more abundant in warm temperate

climates. This was evidenced by statistical modeling that pointed to warm temperate climatic regions as the most favourable ones for *Cx. pipiens* within the study area (Fig. 1; Table 3). It is well known that temperature together with precipitation, relative humidity and wind are key weather factors affecting the behaviour and abundance of mosquitoes (Bidleymayer 1964; Service 1978). *Cx. pipiens* developmental rate, longevity and diapausing period are widely influenced by temperature (Alto et al. 2010). *Cx. pipiens* larvae hatch in one day at 30° C while they take 10 days at 10°C and stop development at 4°C (Becker et al. 2010). A temperature increase accelerates the development and frequency of blood meals while reducing the length of gonotrophic cycles – the time taken by a female from blood meal intake to egg development. Low relative air humidity accelerates mosquito mortality rates (Clements 1963). However, Vanderlinde et al. (1990) reported that a decrease in VPD increased the average life expectancy of *Cx. pipiens*. Our results would a priori agree with this latter finding although the positive influence of VPD on *Cx. pipiens* abundance could be a reflex of the higher *Cx. pipiens* abundance in summer (Gardner et al. 2012) – the driest season in continental Iberia.

The influence of host abundance on vector abundance has been scarcely assessed in mosquitoes but is a primary driver of tick and biting midge population dynamics at local scales (Acevedo et al. 2010; Ruiz-Fons and Gilbert 2010; Ruiz-Fons et al. 2012). Becker et al (2010) reported that there is an interaction between the availability of suitable hosts and the distribution of mosquito species while other authors showed a link between host availability and the length of the oviposition cycle (Higgs et al. 2004) that could affect abundance. The parallel finding of a positive influence of human and domestic ruminant density suggests that mammals substantially contribute to the abundance of *Cx. pipiens* in aquatic non-urban sites, especially since survey locations

were not selected to be close to livestock or human settlements. This could be reflecting not only an effect of the availability of hosts for *Cx. pipiens* females but additionally that human activities favour breeding sites for *Cx. pipiens*. Vinogradova (2000) reported that there are strong ecological associations between humans and *Cx. pipiens* due to the ancestral spaces shared between them, leading to a strong association between *Cx. pipiens* distribution and urbanization (Fonseca et al. 2004). The traditional classification of *Cx. pipiens* as predominantly ornitophilic seems controversial. In Georgia, *Cx. pipiens* from rural areas fed mostly on birds and cattle whereas in urban areas they fed mainly on mammals (Sichinava 1978). Zimmerman et al (1985) reported that 48% of *Cx. pipiens* in rural areas of Egypt fed on humans while only 2% fed on birds. Studies in Spain showed a low proportion of *Cx. pipiens* females feeding on birds in the metropolitan area of Barcelona, where they mainly fed on humans (Muñoz et al. 2011). However, Alcaide et al. (2009) reported that birds accounted for the 64% of *Cx. pipiens* meals in Doñana Natural Park, southern Spain. Discrepancies between studies suggest that host selection by *Cx. pipiens* females should be related to host abundance rather than to host preferences (Farajollahi et al. 2011). Nonetheless, differences in host preferences observed between *Cx. pipiens* biotypes *pipiens* and *molestus* and their ability to hybridize should be kept in mind when analyzing the influence of host abundance and host community composition on *Cx. pipiens* feeding patterns. This is especially relevant since identifying factors modulating feeding patterns of *Cx. pipiens* is highly relevant due to the different epidemiological roles played by birds and mammals with respect to different *Cx. pipiens*-borne pathogens (Platt et al. 2007).

## Acknowledgements

We thank the Spanish National Meteorological Agency (AEMET; Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) for providing climatic data employed in this study. We also wish to thank the regional government (Junta de Comunidades de Castilla – La Mancha - JCCM) for providing us with livestock data and João Teixeira (CIBIO, Porto), Lucia Verdicchio (University of Torino) and Rocío Pinal and Sarah Delacour (University of Zaragoza) for their help with field and lab work. The study was funded by project POII09-0141-8176 from JCCM and EU-FEDER. F. Ruiz-Fons was funded by a Juan de la Cierva contract (Ministerio de Economía y Competitividad) and P. Acevedo was supported by a Beatriu de Pinós fellowship funded by “Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament d’Innovació, Universitats i Empresa” of the Generalitat de Catalunya, and the COFUND Programme - Marie Curie Actions under 7th Marc Programme of the European Community. The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Acevedo P, et al. (2010) A Broad Assessment of Factors Determining *Culicoides imicola* Abundance: Modelling the Present and Forecasting Its Future in Climate Change Scenarios. Plos One 5(12)
- AEMET (2011) Agencia Estatal de Meteorología. Gobierno de España.  
<http://www.aemet.es>
- Akaike H (1974) New look at statistical-model identification. Transactions on Automatic Control 19(6):716-723
- Alcaide M, Rico C, Ruiz S, Soriguer R, Muñoz J, Figuerola J (2009) Disentangling Vector-Borne Transmission Networks: A Universal DNA Barcoding Method to Identify Vertebrate Hosts from Arthropod Bloodmeals. Plos one 4(9)
- Alto BW, Mutur EJ, Ampan L (2012) Effects of nutrition and density in *Culex pipiens* Medical and Veterinary Entomology
- Becker N (1989) Life strategies of mosquitoes as an adaptation to their habitats. Bulletin of the Society for Vector Ecology 14(1):6-25
- Becker N, et al. (2010) Mosquitoes and their control, 2 nd edn. Springer, Heidelberg
- Bidlingmayer WL (1974) The influence of environmental factors and physiological stage on flight patterns of mosquitoes taken in the vehicle aspirator and truck,

- suction, bait and new jersey light traps. *Journal of Medical Entomology* 11:119-146
- Bogh C, Pedersen EM, Mukoko DA, Ouma JH (1998) Permethrin-impregnated bednet effects on resting and feeding behaviour of lymphatic filariasis vector mosquitoes in Kenya. *Medical and Veterinary Entomology* 12(1):52-59
- Brust RA, Costello RA (1969) Mosquitoes of Manitoba. II. The effect of storage temperature and relative humidity on hatching of eggs of *Aedes vexans* and *Aedes abserratus* (Diptera: *Culicidae*). *Can Entomol* 101:1285-1291
- Busquets N, Alba A, Allepuz A, Aranda C, Nunez JI (2008) Usutu virus sequences in *Culex pipiens* (Diptera: *Culicidae*), Spain. *Emerging Infectious Diseases* 14(5):861-863
- Chapman RF (1982) *The insects: structure and function*. Hodder and Stoughton, London
- Ciota AT, Drummond CL, Drobnack J, Ruby MA, Kramer LD, Ebel GD (2011) Emergence of *Culex pipiens* from overwintering hibernacula. *Journal of the American Mosquito Control Association* 27(1):21-9
- Clements AN (1963) *The physiology of mosquitoes*. International Series of Monographs on Pure and Applied Biology 17:176-182
- Farajollahi A, Fonseca DM, Kramer LD, Kilpatrick AM (2011) "Bird biting" mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infection Genetics and Evolution* 11(7):1577-1585
- Figuerola J, Soriguer R, Rojo G, Tejedor CG, Jimenez-Clavero MA (2007) Seroconversion in wild birds and local circulation of West Nile virus, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 13(12):1915-1917
- Fonseca DM, et al. (2004) Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science* 303(5663):1535-1538
- Gardner AM, Hamer GL, Hines AM, Newman CM, Walker ED, Ruiz MO (2012) Weather Variability Affects Abundance of Larval *Culex* (Diptera: *Culicidae*) in Storm Water Catch Basins in Suburban Chicago. *Journal of Medical Entomology* 49(2):270-276
- Hesson JC, Östman O, Schäfer M, Lundström JO (2011) Geographic distribution and relative abundance of the sibling vector species *Culex torrentium* and *Culex pipiens* in Sweden. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11: 1383-1389
- Gillespie BI, Belton P (1980) Oviposition of *Culex pipiens* in water at different temperatures. *Journal of Entomological Society BC* 77:34-36
- Giménez B (1999) Madrid, Castilla – La Mancha. National Geographic Society, Barcelona
- Gutiérrez-Guzmán AV, Vicente J, Sobrino R, Perez-Ramírez E, Llorente F, Höfle U (2012) Antibodies to West Nile virus and related flaviviruses in wild boar, red foxes and other mesomammals from Spain *Veterinary Microbiology In press*
- Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL (2005) Epidemiology and transmission dynamics of West Nile Virus disease. *Emerging Infectious Diseases* 11(8):1167-1173
- Higgs S, Snow K, Gould EA (2004) The potential for West Nile virus to establish outside of its natural range: a consideration of potential mosquito vectors in the United Kingdom. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98(2):82-87
- Höfle U, et al. (2008) West Nile virus in the endangered Spanish imperial eagle. *Veterinary Microbiology* 129(1-2):171-178
- INE (2011) Instituto Nacional de Estadística. Gobierno de España.



- <http://www.ine.es>
- Jenks G (1967) The data model concept in statistical mapping. *International Yearbook of Cartography* 7:186–190
- Kent RJ, Harrington LC, Norris DE (2007) Genetic differences between *Culex pipiens* f. molestus and *Culex pipiens pipiens* (Diptera : *Culicidae*) in New York. *Journal of Medical Entomology* 44(1):50-59
- Kilpatrick AM, Kramer LD, Campbell SR, Alleyne EO, Dobson AP, Daszak P (2005) West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm. *Emerging Infectious Diseases* 11(3):425-429
- Legendre P (1993) Spatial autocorrelation trouble or new paradigm. *Ecology* 74(6):1659-1673
- Miller BR, Crabtree MB, Savage HM (1996) Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Insect Molecular Biology* 5(2):93-107
- Muñoz J, Eritja R, Alcaide M, Montalvo T, Soriguer RC, Figuerola J (2011) Host-Feeding Patterns of Native *Culex pipiens* and Invasive *Aedes albopictus* Mosquitoes (Diptera: *Culicidae*) in Urban Zones From Barcelona, Spain. *Journal of Medical Entomology* 48(4):956-960
- Pesko K, Mores CN (2009) Effect of Sequential Exposure on Infection and Dissemination Rates for West Nile and St. Louis Encephalitis Viruses in *Culex quinquefasciatus*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 9 (3):281-286
- Platt KB, et al. (2007) West Nile virus viremia in eastern Chipmunks (*Tamias striatus*) sufficient for infecting different mosquitoes. *Emerging Infectious Diseases* 13(6):831-837
- Ruiz-Fons F, et al. (2008). Epidemiological risk factors of Aujeszky's disease in wild boars (*Sus scrofa*) and domestic pigs in Spain. *European Journal of Wildlife Research* 54:549 –555
- Ruiz-Fons F, Gilbert L (2010) The role of deer as vehicles to move ticks, *Ixodes ricinus*, between contrasting habitats. *International Journal for Parasitology* 40(9):1013-1020
- Ruiz-Fons F, Fernandez-de-Mera IG, Acevedo P, Gortazar C, de la Fuente J (2012) Factors Driving the Abundance of *Ixodes ricinus* Ticks and the Prevalence of Zoonotic *I. ricinus*-Borne Pathogens in Natural Foci. *Applied and Environmental Microbiology* 78(8):2669-2676
- Savage HM (2006) Oviposition activity patterns and West Nile virus infection rates for members of the *Culex pipiens* complex at different habitat-types within the hybrid zone, Shelby County, TN, 2002 (Diptera: *Culicidae*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75(5):73-73
- Schaffner F, Angel G, Geoffroy B, Hervy JP, Rhaiem A, Brunhes J (2001) The Mosquitoes of Europe / Les Moustiques d'Europe: An Identification and Training Programme. IRD Éditions & EID Méditerranée, Montpellier CD-rom
- Service MW (1978) The effect of weather on mosquito biology Wheater and parasitic animal disease. World Metereological Organisation, Geneva 15:151-167
- Shin EH, Lee WJ, Lee HI, Lee DK, Klein TA (2005) Seasonal population density and daily survival of anopheline mosquitoes (Diptera: *Culicidae*) in a malaria endemic area, Republic of Korea. *Journal of Vector Ecology* 30 (1):33-40
- Sichinava SG (1978) Study of the biology and ecology of mosquitoes of *Culex pipiens* complex (*Culicidae*) in abkhazia. *Parazitologiya* 12:523-529
- Sonenshine DE, Lane RS, Nicholson WL (2002) Ticks (*Ixodida*). In: Mullen G, Durden L (eds) *Medical and Veterinary Entomology*. Academia Press, Orlando 517–558

- Turell MJ, Gargan TP, Bailey CL (1984) Replication and dissemination of Rift Valley fever virus in *Culex pipiens*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 33(1):176-181
- Vanderlinde TCD, Hewitt PH, Nel A, Vanderwesthuizen MC (1990) The influence of different constant temperatures and saturation deficits on the survival of adult *Culex-(culex)-theileri* theobald (Diptera: *Culicidae*) in the laboratory. *Journal of the Entomological Society of Southern Africa* 53(1):57-63
- Vinogradova EB (2000) *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control, Sofia
- Weitzel T, Braun K, Collado A, Joest A, Becker N (2011) Distribution and frequency of *Culex pipiens* and *Culex torrentium* (Culicidae) in Europe and diagnostic allozyme markers. *European Mosquito Bulletin* 29:22-37
- Weng MH, Lien JC, Lin CC, Yao CW (2000) Vector competence of *Culex pipiens molestus* (Diptera: *Culicidae*) from Taiwan for a sympatric strain of Japanese encephalitis virus. *Journal of Medical Entomology* 37(5):780-783
- Yildirim A, Inci A, Duzlu O, Biskin Z, Ica A, Sahin I (2011) *Aedes vexans* and *Culex pipiens* as the potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Central Turkey. *Veterinary Parasitology* 178(1-2):143-147
- Zhao T, Dong Y, Zhu L, Lu B (1999) Morphological study of hybrid larvae obtained from hybridization between members in *Culex pipiens* complex. *Acta Entomologica Sinica* 42(3):264-269
- Zimmerman JH, Hanafi A, Abassy MM (1985) Host-feeding patterns of *Culex* mosquitoes (Diptera: *Culicidae*) on farms in Gharbiya Governate, Egypt. *Journal of Medical Entomology* 22: 82-87

# Capítulo 3

---



## **Biting midges (Diptera: *Ceratopogonidae*) in unfarmed habitats of inland Iberia: searching for potential bluetongue virus vectors**

Mauricio Durán-Martínez, Pelayo Acevedo, Javier Lucientes, Christian Gortázar,

Francisco Ruiz-Fons

(En preparación)



## **Jejenes (Diptera: *Ceratopogonidae*) en zonas no ganaderas del interior de la península ibérica: en busca de vectores potenciales del virus de la lengua azul**

### **Resumen**

La lengua azul continúa siendo endémica en varias regiones del sur de Europa a pesar de los esfuerzos de las autoridades de sanidad animal para su control, lo que en parte puede deberse a la existencia de reservorios silvestres del virus de la lengua azul (VLA). En Europa se consideraba que el VLA era transmitido sólo por *Culicoides imicola*. Después de la aparición de varios serotipos del VLA en diferentes países europeos en las últimas décadas, los grupos de *C. obsoletus* y *C. pulicaris* también fueron identificados como vectores relevantes del VLA. Sin embargo, ningún estudio ha sido llevado a cabo en Europa para determinar la presencia, distribución y abundancia de vectores del VLA en zonas no ganaderas a pesar de que los ungulados silvestres son reservorios del virus. Por lo tanto, este trabajo tiene como objetivo comprender la epidemiología de la lengua azul y otros agentes patógenos transmitidos por *Culicoides* en localidades no ganaderas dentro de un gradiente ambiental y climático en el centro-sur de España a través del estudio de la comunidad de jejenes. Ciento setenta y nueve jejenes de trece especies fueron capturados en 39 localidades en el centro-sur de España. *C. punctatus* (34,6%), seguido por *C. circumscriptus* y *C. pulicaris* (ambos 13,4%), *C. newsteadi* (11,7%), *C. festivipennis* (7,8%), *C. odibilis* y *C. sphagnumensis* (ambos 4,5%) y el grupo *C. fascipennis* (3,4%) fueron las especies más abundantes. El estudio revela que la abundancia de los dos principales vectores de la lengua azul en Europa – *C. imicola* y el grupo *C. obsoletus* – es muy bajo en localidades no ganaderas en una región donde ambas especies son abundantes en explotaciones ganaderas. Sin embargo, el grupo *C. pulicaris* se encuentra ampliamente distribuido en los sitios de estudio. Este

hallazgo, junto con la evidencia de que el VLA circula en las poblaciones de ungulados silvestres en la región de estudio sugiere que el grupo *C. pulicaris* - *C. punctatus*, *C. pulicaris* y tal vez *C. newsteadi* - puede contribuir a la circulación del VLA en un ciclo silvestre en el interior de la península ibérica, y posiblemente en otros hábitats de Europa.

### **Abstract**

Bluetongue remains endemic in several regions of southern Europe in spite of the great control effort carried out by animal health authorities, which may partly be due to the existence of wild reservoirs of bluetongue virus (BTV). BTV was deemed to be transmitted in Europe only by *Culicoides imicola*. After the appearance of several BTV serotypes in different European countries in the last decades, *C. obsoletus* and *C. pulicaris* groups were identified as relevant BTV vectors too. However, no study has been carried out in Europe to determine the presence, distribution and abundance of BTV vectors in unfarmed sites even though wild ungulates are BTV reservoirs. Thus, we aimed to understand the epidemiology of BTV and other *Culicoides*-borne pathogens in unfarmed sites within an environmental and climatic gradient in south-central Spain through the study of biting midge communities. One hundred and seventy-nine biting midges of thirteen species were captured in 39 localities in south-central Spain. *C. punctatus* (34.6%) followed by *C. circumscriptus* and *C. pulicaris* (both 13.4%), *C. newsteadi* (11.7%), *C. festivipennis* (7.8%), *C. odibilis* and *C. sphagnumensis* groups (both 4.5%) and *C. fascipennis* group (3.4%) were the most abundant species. The study reveals that the abundance of the two main BTV vectors in Europe – *C. imicola* and the *C. obsoletus* group – is very low in unfarmed sites in a region where both species are abundant in livestock premises. However, the *C. pulicaris* group was

widely distributed in the study sites. This finding together with the evidence that BTV circulates in wild ungulate populations in the study region suggests that *C. pulicaris* group – *C. punctatus*, *C. pulicaris* and perhaps *C. newsteady* – may contribute to BTV circulation in a sylvatic cycle in inner continental Iberia, and possibly in other habitats of Europe.

## **Introduction**

Europe is probably one of the areas in the world at higher risk of emerging infectious diseases (Jones et al. 2008) and vector-borne diseases are amongst the most important emerging threats (Weaver and Reisen 2010). This has been apparently confirmed by the emergence of different vector-borne diseases in Europe in the last decades, being Schmallenberg virus the most recent of them (Hoffmann et al. 2012).

Among recently emergent vector-borne diseases those transmitted by biting midges – especially African horse sickness (AHS) and bluetongue (BT) – have caused important losses to the livestock industry. AHS only affected some countries in southern Europe (Sánchez-Vizcaíno 2004), but BT spread over a high number of European countries even establishing enzooticity in some of them (RASVE 2011). Currently, AHS virus (AHSV) is endemic in most parts of tropical Africa. However, the virus spread outside African endemic areas to countries in Asia and Europe in the second half of the XXth century (Purse et al. 2008) showing that it may re-emerge in southern Europe in the future. AHSV was isolated from *Culicoides imicola*, *C. obsoletus* group and *C. pulicaris* group in Iberia (Mellor et al. 1990), indicating that the epidemiology of AHSV may be driven by different vector species. BT is an important disease of ruminants – mainly sheep and cattle – that causes high economic losses due to the restrictions in animal movements and banning measures on international trade (Bram et

al. 2002; Maclachlan 2010). BT is caused by 26 different serotypes of BT virus (BTV) that differ in distribution and particular individual traits. The appearance of serotype 8 of BTV in west-central Europe in 2006 knocked down theories that predicted the restriction of BTV under latitude 40°N. Theories were based on the belief that only *C. imicola* could efficiently vector BTV in Europe and on the restriction of this species to areas below this latitude. Due to the effective spread of BTV into areas where *C. imicola* was absent, the scientific community put their efforts on disentangling the role of autochthonous Palearctic *Culicoides* spp. as vectors. Consequently, new effective vectors were evidenced; mainly species in the *C. obsoletus* group (Purse et al. 2008). BTV has been additionally isolated from a third group of biting midge species – *C. pulicaris* (Caraccapa et al. 2003), which was also found to be highly susceptible to BTV infection (Carpenter et al. 2006).

Biting midges of the genus *Culicoides* Latreille (1809) are distributed almost worldwide excluding the Antarctica and New Zealand. All around the world there are around 1.400 species (Borkent 2005). In Europe, 116 species of *Culicoides* have been described (Szadziewski and Borkent, 2004) and the Iberian Peninsula accounts for an important number of these European species – 61 in Spain, 47 in Portugal and 6 in Andorra (Rawlings 1997; Delécolle 2002; Sarto-Monteys and Saiz-Ardanaz 2003). Apart from AHSV and BTV, *Culicoides* spp. may transmit different pathogens to a diversity of domestic and wild animal hosts and humans such as filarial nematodes, protozoa and other arboviruses that cause important diseases in tropical and subtropical regions of the world (Mellor et al. 2000; Borkent, 2005). Hence, the global sanitary relevance of *Culicoides* biting midges in Europe goes beyond AHSV and BTV.

BT outbreaks resulted in a significant increase in knowledge on the community composition, abundance and distribution of *Culicoides* spp. across the whole Europe.



However, the major part of entomological studies was carried out on livestock premises, thus biasing results to particular vector species linked to livestock. Currently, information on the community composition, abundance and distribution of *Culicoides* spp. in non-farmed sites is scarce. This seems to be counterproductive for the effective control of BT and its vectors since BTV does not only infect domestic ruminants but also wild ruminants (Ruiz-Fons et al. 2008a; Linden et al. 2010; Rodríguez-Sánchez et al. 2010; García-Bocanegra et al. 2011). Additionally, wild ruminants may be competent viral reservoir hosts (López-Olvera et al., 2010), leading to the establishment of endemic sylvatic cycles even in the absence of the virus in domestics (García-Bocanegra et al. 2011; Falconi et al. 2012). Furthermore, European wild ungulate populations have increased in density and distribution in the last decades (Acevedo et al. 2005, 2008; Ward 2005), increasing therefore the probability of extension of enzooticity of BTV sylvatic cycles.

The current panorama in the Iberian Peninsula where BTV outbreaks in livestock are ongoing (RASVE 2011), where wild ruminant densities are increasing and where climatic conditions are changing due to global climate change – consequently changing vector population dynamics (Acevedo et al. 2010) – implies the need of improved knowledge on the epidemiology of BTV. Studying basic ecology of vector populations in unfarmed habitats is crucial for understanding epidemiological drivers of the sylvatic cycle of BTV, which in the end is intimately connected with the domestic cycle. Thus, research efforts were herein focused in studying the composition and abundance of *Culicoides* spp. in non-farmed sites in continental Mediterranean habitats of inland Iberia.

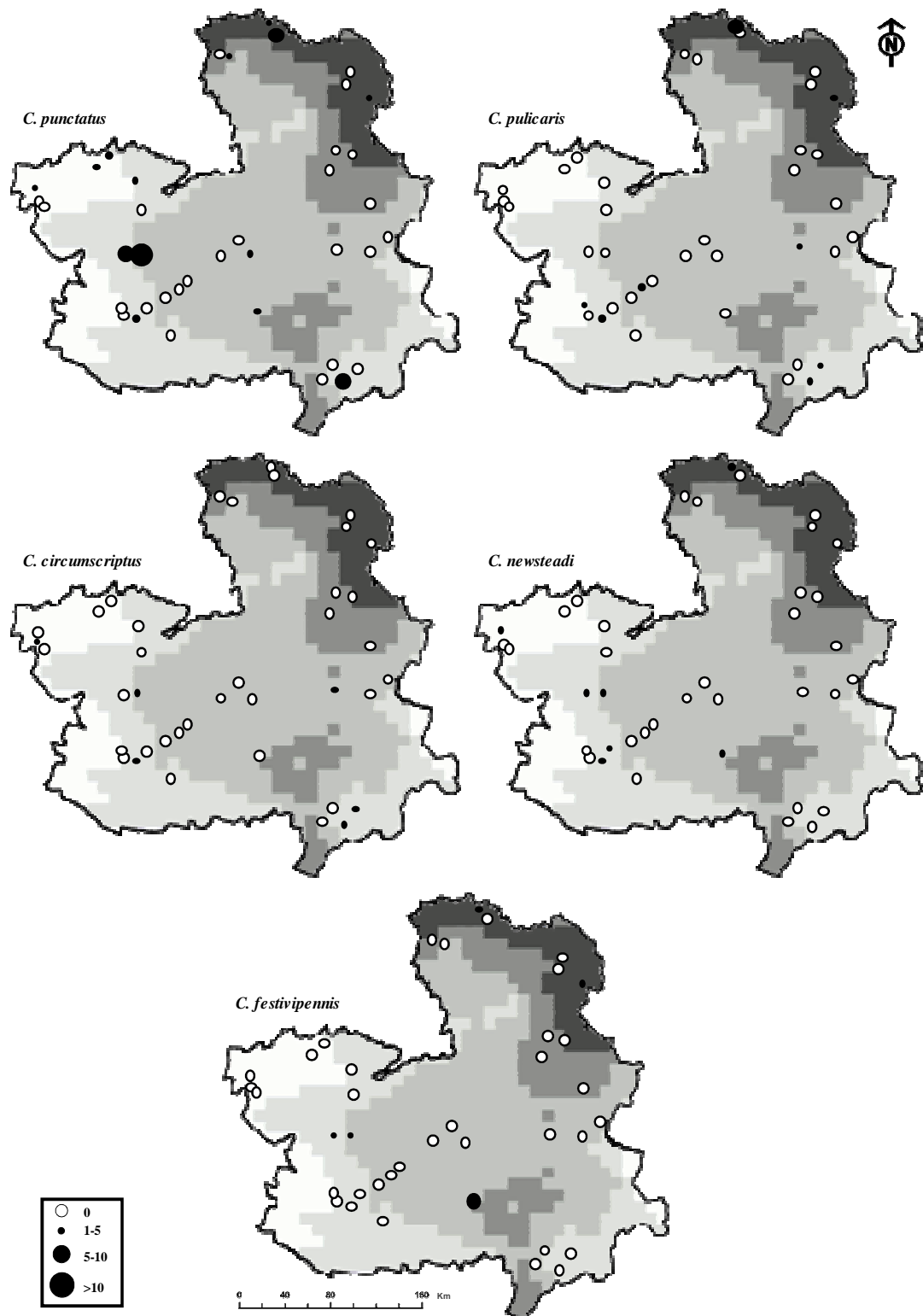
## **Material and methods**

### *Sampling site selection criteria*

The Spanish Autonomous Community of Castilla - La Mancha (CLM) extends over 79.463 km<sup>2</sup> in the Spanish Plateau, constituting 15.7% of the mainland Spanish territory. The region is characterized by a continental Mediterranean climate with extreme temperature ranges and an average rainfall of 400 mm with large seasonal contrasts (Giménez 1999).

Climatic conditions may greatly vary between different environments in CLM mainly due to altitude and geographic location. Thus, in order to stratify the survey the main climatic regions in CLM were determined. For this, the 905 UTM 10x10 km squares in CLM were characterized by 27 climatic and spatial variables (Table 1). A Principal Component Analysis (PCA) was performed over these variables and the first factor retained from the PCA was used to climatically regionalize the study area. The values of the first factor were classified by using Jenks Natural Breaks Classification method (Jenks 1967). This method optimizes the classification of continuous data into discrete categories by reducing the variance within each class while maximizing the variance between classes. We obtained five different climatic regions in our study area that were taken into account for selection of the sampling sites (Fig. 1). Sampling sites (n=39) were randomly selected from each climatic region according to the presence of permanent water bodies (i.e. rivers, lagoons or streams) in a proportional number to the surface of each region.

**Figure 1.** Maps of the study region (CLM) showing the geographic distribution and abundance of the most abundant *Culicoides* spp. through the five climatic regions in which the study area was divided. Climatic regions 1 to 5 are represented by decreasing intensity in grey colour within the map (from dark grey for region 1 to white for region 5).



*Biting midge survey*

The survey of biting midges was conducted in three different periods in 2009 and 2010: autumn 2009 (Oct-Nov), spring-summer 2010 (May-July) and summer-autumn 2010 (Aug-Sep) in order to cover the main activity peaks of the different *Culicoides* spp. in the Mediterranean basin (Ortega et al. 1998). Surveys were not carried out during the winter time because cold conditions are known to decrease the activity of biting midges to a minimum. In each of the sampling sites a capture station was placed from dusk to dawn (approximately from 8:00 pm to 8:00 am) during one night per period. A capture station consisted in three Centers for Disease Control (CDC) traps "Mosquito Light Trap" (Mod2504 *Curtis Dyna-FogUS*®, Westfield, USA), two of them equipped with a white light lamp (CDC-W) and one equipped with an ultraviolet light (CDC-UV). Traps were hung from a horizontal structure to allow the light source to remain at a height of 1.5 m from the ground (Cagienard et al. 2006). Each of the 3 traps of a capture station was placed at a minimum distance of 20 m to avoid interferences with the rest. Each trap was checked at dawn, the basket catch withdrawn and the captured insects placed in coolers for euthanasia. Once dead, insects were placed in 50 ml labelled containers, preserved in ice during transport and stored frozen at -20°C. Biting midges were first identified at species-group level according to wing patterns under a stereoscopic microscope (Rawlings 1997). An accurate morphological identification was later performed over individuals; they were dissected using sterilized ultrafine tweezers, mounted on slides with Canada balsam and examined under a microscope. Different taxonomic keys were employed for classification (Campbell and Pelham-Clinton 1960; Kremer 1965; Delécolle 1985; Glukhova 1989).

**Table 1.** Environmental variables gathered for each of the 905 10x10 km UTM squares of the study region and their relation with the first factor obtained from the principal component analysis (PCA). The mean value of every variable at each climatic region obtained with the PCA factor (see text and Fig. 1) and its associated standard error (within brackets) are also shown.

Variable	Factor	Bioclimatic region				
		1	2	3	4	5
Longitude (m) <sup>1</sup>	-0.321	56.5 (0.6)	55. (0.3)6	52.1 (0.3)	47.1 (0.7)	38.9 (0.9)
Latitude (m) <sup>1</sup>	-0.652	452.0 (0.4)	441.2 (0.9)	437.4 (0.4)	433.9 (0.5)	435.9 (0.6)
Difference in altitude (m)	-0.407	368.2 (20.1)	331.5 (16.7)	198.6 (9.4)	317.2 (12.4)	293.2 (12.4)
Mean annual no. of days with hail <sup>2</sup>	-0.518	4.3 (0.2)	3.5 (0.1)	2.9 (0.1)	2.4 (0.1)	2.9 (0.1)
Mean annual no. of frost days <sup>2</sup>	-0.760	105.3 (0.7)	79.5 (1.1)	69.5 (0.4)	51.1 (0.9)	36.8 (0.6)
Mean annual no. of days with precipitation >0.1mm <sup>2</sup>	-0.599	79.0 (1.9)	70.1 (1.2)	61.8 (0.5)	58.1 (0.9)	61.1 (0.8)
Mean annual no. of foggy days <sup>2</sup>	-0.792	18.0 (0.7)	12.4 (0.6)	4.2 (0.1)	2.0 (0.1)	1.1 (0.1)
Runoff (mm)	-0.484	158.9 (13.1)	148.1 (8.8)	60.4 (4.4)	77.8 (5.8)	154.0 (10.9)
Average annual potential evapotranspiration (mm) <sup>2</sup>	0.856	654.0 (2.8)	733.5 (3.9)	786.7 (2.0)	818.5 (2.2)	850.2 (3.6)
Average annual actual evapotranspiration (mm)	-0.549	573.3 (8.2)	595.8 (8.7)	461.3 (4.9)	467.0 (6.5)	609.4 (10.5)
Mean relative air humidity in January (HUJ; %) <sup>2</sup>	0.424	87.0 (0.2)	88.2 (0.2)	90.4 (0.1)	88.6 (0.2)	89.3 (0.3)
Mean relative air humidity in July (HUJU; %) <sup>2</sup>	-0.534	70.6 (0.3)	65.5 (0.5)	63.2 (0.2)	62.2 (0.3)	62.7 (0.6)
Continentality index <sup>2,3</sup>	0.235	21.6 (0.9)	26.1 (0.8)	29.0 (0.5)	29.1 (0.6)	28.5 (0.7)
Moisture Index <sup>2,4</sup>	-0.593	88.3 (3.2)	73.1 (2.6)	56.2 (1.1)	52.4 (1.4)	62.5 (2.0)
Mean annual insolation (hours year <sup>-1</sup> ) <sup>2,5</sup>	0.857	24.8 (0.1)	27.5 (0.1)	28.9 (0.0)	28.7 (0.0)	29.3 (6.9)
Rainfall regularity	0.286	28.7 (0.2)	30.9 (0.2)	30.9 (0.1)	30.8 (0.1)	30.0 (0.1)
Slope (degrees)	-0.444	3.0 (0.2)	2.8 (0.2)	1.5 (0.1)	2.4 (0.1)	2.3 (0.1)
Soil permeability	0.066	2.4 (0.1)	2.5 (0.1)	2.5 (0.0)	2.0 (0.1)	2.0 (0.1)
Average annual accumulated precipitation (P; mm) <sup>2</sup>	-0.647	684.1 (22.6)	621.8 (12.3)	464.0 (5.7)	473.4 (8.6)	621.1 (13.1)
Average annual maximum precipitation in 24 hours (PM24; mm) <sup>2</sup>	0.123	93.4 (1.9)	100.9 (2.3)	102.3 (1.6)	134.8 (2.8)	151.5 (4.8)
Average annual relative maximum precipitation (P/PM24)	0.460	0.1 (0.0)	0.2 (0.0)	0.2 (0.0)	0.3 (0.0)	0.3 (0.0)
Average annual solar radiation (Kwh m <sup>-2</sup> day <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	0.731	441.2 (1.4)	471.3 (1.4)	479.3 (0.5)	476.7 (0.5)	472.1 (0.6)
Mean temperature in January (TEJ; °C) <sup>2</sup>	0.876	0.8 (0.1)	3.3 (0.1)	4.5 (0.0)	5.3 (0.1)	6.1 (0.1)
Mean temperature in July (TEJU; °C) <sup>2</sup>	0.909	19.7 (0.1)	21.8 (0.1)	24.0 (0.1)	24.5 (0.1)	25.3 (0.1)
Average annual mean temperature (°C) <sup>2</sup>	0.906	9.5 (0.1)	11.7 (0.1)	13.5 (0.1)	14.2 (0.1)	14.9 (0.1)
Average annual air humidity range (HUJ-HUJU; %)	0.715	16.4 (0.3)	22.7 (0.5)	27.2 (0.2)	26.5 (0.2)	26.6 (0.5)
Average annual temperature range (TEJU-TEJ; %)	0.354	18.9 (0.1)	18.6 (0.1)	19.5 (0.1)	19.2 (0.1)	19.1 (0.1)

**Table 2.** Relationship between biogeographical variables in each of the four factors considered for statistical analyses and the abundance of *C. pulicaris* group. The Spearman correlation coefficient ( $\rho$ ) or the  $\chi^2$  value for categorical predictors, the significance value ( $p$ ), the arithmetic mean and its associated standard error as well as value ranges for continuous predictor variables are shown. Variables that were selected for multivariate modelling are marked with an asterisk.

Environmental Factor	Variable code	Variable description	$\rho/\chi^2$	$p$	Mean (SE)	Range
Geography	Lo*	Longitude (m/10 <sup>-3</sup> )			482.5 (8.7)	314.1-627.6
	La*	Latitude (m(10 <sup>-4</sup> ))			439.2 (0.9)	425.2-456.6
Climate	Alt*	Altitude (m)			743.0 (24.8)	324.0-1416.0
	Cr*	Climatic region (categorical)			---	---
	T	Mean temperature of sampling day (°C)			17.4 (0.5)	2.6-29.0
	Tm	Average mean temperature 30 days bs (°C)			18.8 (0.4)	11.9-28.6
	Ts	Average mean temperature 180 days bs (°C)			16.1 (0.6)	6.1-25.5
	Tan*	Average mean temperature 365 days bs (°C)			14.6 (0.2)	10.2-16.7
	Tw	Average winter mean temperature (°C)			6.1 (0.2)	2.9-8.4
	Pm	Accumulated precipitation in 30 days bs (mm)			39.4 (2.0)	4.3-90.3
	Pt	Accumulated precipitation in 90 days bs (mm)			127.7 (8.0)	13.4-339.4
	Ps	Accumulated precipitation in 180 days bs (mm)			309.1 (18.7)	52.1-768.5
	Pan*	Accumulated precipitation in 365 days bs (mm)			593.8 (19.0)	281.3-1123.6
	RH*	Mean relative humidity of the sampling day (%)			59.2 (1.2)	32.5-92.5
	RHm	Average relative humidity of 30 days bs (%)			57.3 (1.2)	13.0-86.0
	VSD	Water vapour saturation deficit (mm)			878.1 (44.2)	105.1-2321.3
	VSDm*	Water vapour saturation deficit for 30 days bs (mm)			1037.9 (50.8)	237.0-2578.8
Ws*	Average wind speed of the sampling day (Km/h)			5.5 (0.4)	0.0-22.2	
Habitat	Veg*	Vegetation type (categorical)			---	---
Hosts	Rd_fav	Favourability function for red deer			0.617 (0.017)	0.270-0.889
	Rod_fav	Favourability function for roe deer			0.473 (0.022)	0.087-0.928
	Wb_fav	Favourability function for wild boar			0.505 (0.017)	0.125-0.758
	Wu_fav*	Favourability function for wild ungulates			0.532 (0.014)	0.265-0.795
	Do	Density of sheep in the municipality (n°/Ha)			1.191 (0.590)	0.000-35.941
	Db	Density of cattle in the municipality (n°/Ha)			0.184 (0.047)	0.000-2.173
	Dc	Density of goats in the municipality (n°/Ha)			0.081 (0.030)	0.000-1.780
	Do_f	Density of sheep farms in the municipality (n°/Ha)			0.012 (0.096)	0.000-1.000
	Db_f	Density of cattle farms in the municipality (n°/Ha)			0.001 (0.000)	0.000-0.014
	Dc_f	Density of goat farms in the municipality (n°/Ha)			0.002 (0.000)	0.000-0.003
	Drum	Density of ruminants in the municipality (n°/Ha)			1.457 (0.626)	0.000-38.169
	Drum_f*	Density of ruminant farms in the municipality (n°/Ha)			0.004 (0.001)	0.000-0.087
	Dt*	Distance to the nearest town (Km)			2.49 (0.29)	0.00-11.80

*Ecogeographical variables*

Environmental conditions are key drivers of the abundance of arthropod vectors in specific locations because they modulate both their life cycle and activity (Randolph 2009; Ruiz-Fons et al. 2012). Thus, in order to understand the relevance of environmental conditions on the abundance of *Culicoides* biting midges, different variables were gathered for the study sites (Table 2): 33 variables grouped in four factors (geography, climate, habitat and hosts). Variables were selected according to their availability at the study scale and considering their likelihood of having an effect on the abundance of biting midges (Ortega et al. 1999; Acevedo et al. 2010).

Geographic variables: Longitude and latitude were recorded with portable GPS devices.

Climatic variables: Daily series data from 152 meteorological stations in CLM from 2008 to 2010 were provided by the Spanish National Meteorological Agency (AEMET 2011). Temperature, relative humidity, accumulated precipitation and wind speed at different time scales (Table 2) were calculated in relation to sampling date using data from the meteorological station that was closest to the sampling site. Temperature and relative humidity data were used to calculate vapour pressure deficit (VPD). VPD is linearly related to the rate of evapotranspiration and consequently is a measure of the hydric stress to which biting midges are exposed. VPD was calculated as the difference between water vapour saturation pressure (VSP) and water vapour pressure (VP). VSP was calculated according to the Keenan and Keyes formula (<http://ecaaser3.ecaa.ntu.edu.tw/weifang/ebook/psy-data1998.pdf>):

$$\text{Ln}(VSP/R) = \frac{A + BT + CT^2 + DT^3 + ET}{FT + GT^2},$$

where  $R=22105649.25$ ,  $A=-27405.526$ ,  $B=97.5413$ ,  $C=-0.146244$ ,  $D=0.12558 \times 10^{-3}$ ,  $E=-0.48502 \times 10^{-7}$ ,  $F=4.34903$ ,  $G=0.39381 \times 10^{-2}$  and  $T$  is temperature in K.  $VP$  was calculated as:

$$VP = \frac{VSP \times RH}{100},$$

where  $RH$  is the relative humidity in percentage. Climatic region was considered as a measure of spatial variation in environmental conditions while altitude – recorded with portable GPS devices – was included as an indirect measure of climatic variation due to variations in altitude within similar climatic sites.

Habitat variables: Although abundance of certain species of biting midges may be a consequence of passive wind transport (Calvete et al. 2008), calculating the proportion of immigrating midges is difficult. Thus, the majority of midges were considered to be born in the sampling site and hence habitat was only characterized at the sampling site level (within 50m radius from the sampling point). Habitat was grossly classified in typical Mediterranean – evergreen oak (*Quercus ilex*) or pine (*Pinus* spp.) forests mixed with Mediterranean scrubland, agricultural – mainly seasonal cereal plantations and vineyards mixed with scattered patches of olive trees – and riparian vegetation.

Host related variables: As only *C. pulicaris* and *C. punctatus* were considered for statistical analyses and they mainly feed on mammals (Ninio et al. 2011), only mammal abundance variables were considered in the host factor. The number of cattle, sheep and goat and the number of farms in 2007 in each municipality of CLM were provided by the regional animal health authorities. Data allowed calculating the density of each ruminant species and farms per hectare at the municipality level. The availability of the most frequent wild ungulate hosts (red deer – *Cervus elaphus*, roe deer – *Capreolus capreolus* - and Eurasian wild boar – *Sus scrofa*) was quantified on



the basis of their environmental favourability which was produced in the context of a Spanish epidemiological study focused on *C. imicola* abundance (details of the functions can be obtained in Acevedo et al. 2010). Finally, a proxy of human activity was quantified by the distance from the sampling point to the nearest town, obtained by using geographic information systems.

### *Statistical analyses*

Mann-Whitney U tests were employed to test for differences between trap type – CDC-W vs. CDC-UV – and sex – male vs. female. Subsequently, a multivariate statistical procedure was designed for evidencing the influence of ecogeographical factors on the abundance of *C. pulicaris* and *C. punctatus*, the most frequent species of the *C. pulicaris* group in our study and the only species in the group reported as potential reservoirs of BTV. For this purpose the correlation matrix of variables grouped in the climate and host related factors were constructed. For selection of variables to be included in multivariate analysis, the relationship of each of the 33 predictor variables with the dependent variable (i.e. the abundance of *C. pulicaris* group at each site and period) was established by performing Spearman correlations and Kruskal-Wallis tests in the case of categorical predictors. Only predictors significantly related to the response variable were included in the multivariate analysis (e.g. see Ruiz-Fons et al. 2008b). When highly correlated predictors ( $\rho > 0.5$ ) were statistically linked to the response variable ( $p < 0.05$ ), only the most meaningful predictor was included in the next stage (Table 2). Later on, generalized mixed linear models were developed (Zuur et al. 2010), using binomial negative distribution and logarithmic link function. Control of non-measured local influences on the response variable was exerted by considering sampling site as a random variable in model development. Modelling was built by a forward

stepwise procedure in order of diminishing the Akaike information criterion (AIC; Akaike 1974). Modelling stopped when the addition of new variables to the model did not decrease the AIC. Statistical analyses were carried out with the IBM-SPSS 19.0 Statistical Package software (IBM, Corporation, New York, USA).

## Results

During the survey 179 biting midges were captured. Taxonomical classification showed that all of them belonged to the genus *Culicoides*, of which 13 different species in 6 subgenera were identified (Table 3). One-hundred sixty-three individuals were females (91.1%) while only 16 were males (9.9%;  $Z=-3.190$ ,  $p<0.01$ ). CDC-UV traps captured a higher mean number of biting midges ( $1.9\pm 6.9$  individuals  $\times$  trap station<sup>-1</sup>  $\times$  night<sup>-1</sup>) than CDC-W traps ( $0.7\pm 2.3$  individuals  $\times$  trap station<sup>-1</sup>  $\times$  night<sup>-1</sup>) when data were calculated according to the number of each trap type per trap station. However, differences were not statistically significant, perhaps due to the high number of sites with no captures.

*C. punctatus* was the most common species ( $n=62$ ; 34.6%) followed by *C. circumscriptus* and *C. pulicaris* (both  $n=24$ ; 13.4%), *C. newsteadi* ( $n=21$ ; 11.7%), *C. festivipennis* ( $n=14$ ; 7.8%), *C. odibilis* and *C. sphagnumensis* groups (both  $n=8$ ; 4.5%) and *C. fascipennis* group ( $n=6$ ; 3.4%). The remaining samples accounted for less than 2% of captures and included *C. similis* group, *C. shaklawensis*, *C. univittatus*, *C. parroti* and *C. simulator* group (Table 2). No biting midges were captured in autumn 2009. Nonetheless, midges were captured in the two following sampling periods, being mean *Culicoides* spp. abundance higher in summer-autumn ( $2.7\pm 4.4$  individuals  $\times$  trap station<sup>-1</sup>  $\times$  night<sup>-1</sup>) than in spring-summer ( $1.9\pm 5.1$  individuals  $\times$  trap station<sup>-1</sup>  $\times$  night<sup>-1</sup>) sampling periods (Table 2). This seasonal capture pattern was not maintained through the different *Culicoides* species captured as shown in Table 2. When *C. pulicaris* and *C.*

*punctatus* were grouped in the *C. pulicaris* group a similar mean abundance was found in spring-summer and summer-autumn periods.

**Table 3.** Mean abundance of *Culicoides* spp. (individuals x trap station<sup>-1</sup> x night<sup>-1</sup>) and associated standard error (within brackets) captured per trap station in any of the three periods surveyed: autumn 2009 (1), spring-summer 2010 (2) and summer-autumn 2010 (3).

<i>Culicoides</i> species	Period			Total
	1	2	3	
<i>C. punctatus</i>	0.00 (0.00)	0.81 (2.54)	0.89 (1.73)	0.60 (1.84)
<i>C. pulicaris</i>	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.32 (1.33)	0.22 (1.00)
Subtotal <i>C. pulicaris</i> group	0.00 (0.00)	1.11 (2.90)	1.22 (2.45)	0.82 (2.29)
<i>C. circumscriptus</i>	0.00 (0.00)	0.42 (1.18)	0.14 (0.48)	0.19 (0.76)
<i>C. newsteadi</i>	0.00 (0.00)	0.22 (0.96)	0.22 (0.71)	0.15 (0.71)
<i>C. festivipennis</i>	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.38 (1.19)	0.13 (0.73)
<i>C. odibilis</i> group	0.00 (0.00)	0.06 (0.33)	0.16 (0.50)	0.08 (0.36)
<i>C. sphagnumensis</i> group	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.22 (0.63)	0.08 (0.39)
<i>C. fascipennis</i> group	0.00 (0.00)	0.03 (0.17)	0.14 (0.54)	0.06 (0.34)
<i>C. similis</i> group	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.11 (0.52)	0.04 (0.31)
<i>C. shaklawensis</i>	0.00 (0.00)	0.03 (0.17)	0.05 (0.23)	0.03 (0.17)
<i>C. univittatus</i>	0.00 (0.00)	0.08 (0.28)	0.00 (0.00)	0.03 (0.17)
<i>C. parroti</i>	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.03 (0.16)	0.01 (0.10)
<i>C. simulator</i> group	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.03 (0.16)	0.01 (0.10)
<b>Total</b>	<b>0.00 (0.00)</b>	<b>1.94 (5.07)</b>	<b>2.68 (4.39)</b>	<b>1.63 (4.09)</b>

When looking at the geographic distribution of the 5 most abundant species, *C. punctatus* showed the widest distribution with presence in every climatic region (n=14 positive sites). The highest number of captures (n>5) took place in four sites of climatic regions 1, 3 and 4 (Fig. 1), demonstrating that this species is widely adapted to both warm and cold areas within continental Mediterranean regions (see mean annual temperature in Table 1). *C. pulicaris* was also widely distributed (n=8 sites in 4 climatic regions) although with slightly higher abundance in the coldest climatic region (Fig. 1). *C. circumscriptus* was only present in 6 sampling sites in the warmest climatic regions

(3 to 5) within the study area. Finally, *C. newsteady* was not as geographically restricted as *C. circumscriptus* (n=7 sites in 4 climatic regions) while *C. festivipennis* presented the most restricted distribution within the study area (n=5 sites in 3 climatic regions). Higher mean abundances of *Culicoides* spp. were observed in climatic regions 1 and 4 that also accounted for the highest abundance of the *C. pulicaris* group (Table 4).

Modelling of ecogeographical factors influencing the abundance of individuals in the *C. pulicaris* group only evidenced a marginally significant effect of the average mean temperature of the 180 days before sampling (Table 5), showing that higher temperatures in that period may be related to higher abundances.

**Table 4.** Mean abundance of *Culicoides* spp. (individuals x trap station<sup>-1</sup> x night<sup>-1</sup>) and associated standard error (within brackets) for each of the five climatic regions within the study area. Regions are numbered as shown in Fig. 1.

<i>Culicoides</i> species	Climatic region				
	1	2	3	4	5
<i>C. punctatus</i>	0.88 (1.93)	0.14 (0.54)	0.60 (2.11)	0.79 (2.27)	0.33 (0.82)
<i>C. pulicaris</i>	0.56 (1.99)	0.00 (0.00)	0.10 (0.31)	0.34 (1.11)	0.07 (0.26)
Subtotal <i>C. pulicaris</i> group	1.44 (3.33)	0.14 (0.54)	0.70 (2.10)	1.14 (2.76)	0.40 (0.83)
<i>C. circumscriptus</i>	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.30 (0.88)	0.31 (1.07)	0.13 (0.52)
<i>C. newsteadi</i>	0.06 (0.25)	0.00 (0.00)	0.13 (0.57)	0.34 (1.17)	0.07 (0.26)
<i>C. festivipennis</i>	0.25 (0.78)	0.00 (0.00)	0.30 (1.21)	0.03 (0.19)	0.00 (0.00)
<i>C. odibilis</i> group	0.25 (0.68)	0.00 (0.00)	0.07 (0.25)	0.07 (0.37)	0.00 (0.00)
<i>C. sphagnumensis</i> group	0.19 (0.54)	0.00 (0.00)	0.07 (0.25)	0.00 (0.00)	0.20 (0.78)
<i>C. fascipennis</i> group	0.13 (0.34)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.03 (0.19)	0.20 (0.78)
<i>C. similis</i> group	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.10 (0.56)	0.07 (0.26)
<i>C. shaklawensis</i>	0.06 (0.25)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.07 (0.26)	0.00 (0.00)
<i>C. univittatus</i>	0.06 (0.25)	0.00 (0.00)	0.03 (0.18)	0.03 (0.19)	0.00 (0.00)
<i>C. parroti</i>	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.03 (0.18)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
<i>C. simulator</i> group	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.07 (0.26)
<i>Total</i>	2.44 (5.23)	0.14 (0.54)	1.63 (3.99)	2.14 (5.04)	1.13 (2.39)

**Table 5.** Results of the final statistical model for the abundance of *C. pulicaris* group (individuals x trap station<sup>-1</sup> x night<sup>-1</sup>) showing the statistic (F), the incidence rate ratio (IRR) and its associated standard error (SE), the 95% confidence interval (CI) and the significance value (p) for each of the variables included in the model. Abbreviations are drawn according to Table 1.

Variable	F	IRR	SE	p	95% CI
<i>Intercept</i>	0.942	0.10	17.05	0.425	---
<i>Sampling period</i>	1.949				
Autumn		0.66	1.82	0.495	0.20-2.18
Spring-Summer		6.90	2.74	0.058	0.93-50.91
Summer-Autumn		Ref			
<i>Climate region</i>	1.082				
Region 1		6.33	2.83	0.079	0.80-50.00
Region 2		1.46	2.68	0.702	0.21-10.34
Region 3		0.98	2.38	0.981	0.18-5.49
Region 4		1.12	2.39	0.900	0.20-6.30
Region 5		Ref			
<i>Habitat</i>	0.633				
Mediterranean		2.59	2.34	0.266	0.48-14.00
Agricultural		1.93	2.23	0.414	0.39-9.55
Riparian		Ref			
Wu_f	2.134	0.04	9.43	0.148	0.00-3.25
Dc	1.536	0.15	4.56	0.218	0.00 -3.10
Ts	3.396	1.20	1.11	0.069	0.9 9-1.47

## Discussion

Research efforts to elucidate the ecology of potential BTV vectors have been carried out across Europe only in or around livestock farms. However, BTV may have become endemic in a sylvatic cycle (García-Bocanegra et al. 2011; Falconi et al. 2012) in which vector species are almost unknown. This study reveals that the abundance of the two main BTV vectors in Europe – *C. imicola* and *C. obsoletus* group – is very low in non-farmed sites in a region where both species are abundant in livestock premises (Calvete et al. 2008; Acevedo et al. 2010). However, the *C. pulicaris* group – a potential BTV

vector in Europe – was found to be widely distributed in the study sites. This finding, together with the evidence that BTV circulates in wild ungulate populations in the study region (Ruiz-Fons et al. 2008a; Falconi et al. 2012), suggests that the *C. pulicaris* group may contribute to BTV circulation in a sylvatic cycle.

#### *Methodological considerations*

One of the main particularities of our study that could have partly biased our findings is the fact of sampling just one night per period. However, the survey was conducted during the main seasonal activity period of *Culicoides* species in central Iberia (Ortega et al. 1998) thus providing confidence to relative abundance estimates, especially because sampling effort was similar for the surveyed sites. We might have missed low abundant species but not *C. imicola* and the *C. obsoletus* group that are regularly captured at high abundances in fortnight surveys carried out by the Spanish bluetongue national surveillance programme in domestic ruminant farms (Calvete et al. 2008; Acevedo et al. 2010).

CDC-UV traps are amongst the most employed traps for biting midge capture, especially for those species with crepuscular habits – e.g. *C. imicola* and *C. obsoletus* group (Venter et al. 2009). CDC-UV traps do not allow capturing diurnal species of biting midges (Carpenter et al. 2008; Gerry et al. 2009; Venter et al. 2009) and may hence have underestimated the presence and abundance of those species in the study region. This was the reason for not calculating any index of species diversity in this study.

*Ecology and distribution of Culicoides spp.*

*C. imicola* breeds in moisture retentive soils enriched with organic material while species in the *C. obsoletus* group breed on cattle dung (Meiswinkel et al. 2004). In Spain, *C. obsoletus* is abundant in the north (Calvete et al. 2008) displaying maximum abundance in May to July; in southern Spain it has been recorded in high numbers during spring (Lucientes et al. 2008). Particular breeding preferences of *C. obsoletus* group suggest it should be restricted to sites where livestock is present, and this seems to be confirmed in this study. *C. obsoletus* was also absent from the only location without livestock in a Swedish *Culicoides* survey (Ander et al. 2012). *C. imicola* is abundant in south-western Spain but it is also present in several other Spanish regions except in most of the northern west-central half and the south-east of mainland Spain (Lucientes et al. 2008). Maximum population abundance of *C. imicola* is observed at the end of summer-beginning of autumn (Miranda et al. 2004). In contrast to *C. obsoletus*, no direct link between *C. imicola* and livestock presence has been proposed, for which we expected *C. imicola* would be abundant in non-farmed sites within CLM. But the absence of *C. imicola* in our study shows a low abundance, which together with its high abundance in farms in the region (Acevedo et al. 2010) suggests the existence of a direct link between livestock presence and *C. imicola* abundance. The absence of *C. imicola* is also surprising since wild ungulate abundance in some of the study sites is similar to densities of extensively bred cattle (up to 67 red deer/100 ha; Acevedo et al. 2008). Furthermore, wild ungulates tend to concentrate around ponds along streams in inland Spain, especially during the dry summer season (Vicente et al. 2006), thus concentrating dung in moisture retentive soils. Trap stations located in hunting estates were placed in sites where wild ungulates concentrate at water ponds along seasonal streams, for which organically enriched moisture soils – suitable for *C. imicola* breeding



– were present in these sites. Our results seem to contradict predictions on the abundance of *C. imicola* in Spain for non-farmed sites (Calvete et al. 2008; Acevedo et al. 2010), also changing our perception of the epidemiology of sylvatic cycles of BTV. Further modelling of BTV vector abundance according to their abundance in different epidemiological scenarios seems to be paramount to better understand BTV epidemiology.

Knowledge on the ecology of most *Culicoides* species in Europe is scarce, especially regarding species that are not proven vectors of disease. However, most of the species found in this study – e.g. the *C. pulicaris* group – are also present in or around livestock farms (Ortega et al. 1998, 1999), suggesting that they find favourable reproduction sites and food resources both in presence or absence of livestock. The *C. pulicaris* group is well distributed within the Iberian Peninsula, both in mainland Spain (Ortega et al. 1998; Romón et al. 2012) and mainland Portugal (Capela et al. 2003), but at lower abundances than *C. imicola* and the *C. obsoletus* group. Results in this study also showed that the *C. pulicaris* group is well adapted to different climatic regions within a predominant continental Mediterranean climate (Fig. 1). Only mean temperature over 180 days before sampling took place marginally influenced the abundance of *C. pulicaris* and *C. punctatus* in the study sites, showing that temperature is an important driver of their population dynamics as previously reported (Ortega et al. 1999). However, no influence of livestock and wild ungulate abundance was evidenced, perhaps due to the fact that sampling sites were not selected attending to host abundance.

*Implications for animal health*

Purse et al. (2008) found a better agreement between BTV epidemics distribution in southern Europe and *C. imicola*, *C. obsoletus* and *C. pulicaris* distribution than when only *C. imicola* distribution was considered. The authors reported that this observation indicated that the contribution of *C. obsoletus* and *C. pulicaris* to the transmission of BTV in southern Europe was higher than previously expected. In terms of our survey, in which *C. pulicaris* widely predominated over *C. imicola* and *C. obsoletus*, the *C. pulicaris* group may have a role in BTV maintenance that still remains unclear. Additionally, *C. newsteadi* may play a role in BTV transmission as it belongs to the *C. pulicaris* group (Carpenter et al. 2006). Whatever the real role of any of the species in the *C. pulicaris* group would be, their predominance over the most known vectors of BTV in non-farmed sites in a BTV endemic area (RASVE 2011; Falconi et al. 2012 *In press*) suggests they may have a relevant role that needs to be ascertained. However, disentangling the real role of the *C. pulicaris* group as BTV vector needs of deep research on the relationships between BTV, *C. pulicaris* and ungulates. Furthermore, other *Culicoides* spp. were also present in areas where contact of wild ungulates with BTV has been evidenced (Ruiz-Fons et al. 2008a) and these should also be considered in future studies.

**Acknowledgements**

We thank the Spanish National Meteorological Agency (AEMET; Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) for providing climatic data employed in this study. We also wish to thank the regional government (Junta de Comunidades de Castilla – La Mancha - JCCM) for providing us with livestock data. The study was funded by project POII09-0141-8176 from JCCM and EU-FEDER. We also wish to

the University of Zaragoza for their help with biting midge taxonomy. F. Ruiz-Fons was funded by a Juan de la Cierva contract (Ministerio de Economía y Competitividad). P. Acevedo was supported by a Beatriu de Pinós fellowship funded by Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament d'Innovació, Universitats i Empresa, of the Generalitat de Catalunya, and the COFUND Programme - Marie Curie Actions under 7th Marc Programme of the European Community. The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Acevedo P, Delibes-Mateos M, Escudero MA, Vicente J, Marco J, Gortázar C (2005) Environmental constraints in the colonization sequence of roe deer (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758) across the Iberian Mountains, Spain. *Journal of Biogeography* 32: 1671–1680
- Acevedo P, Ruiz-Fons F, Vicente J, Reyes-García AR, Alzaga V, Gortázar C (2008) Estimating red deer abundance in a wide range of management situations in Mediterranean habitats. *Journal of Zoology* 276: 37–47
- Acevedo P, et al. (2010) A Broad Assessment of Factors Determining *Culicoides imicola* Abundance: Modelling the Present and Forecasting Its Future in Climate Change Scenarios. *Plos one* 5(12)
- AEMET (2011) Agencia Estatal de Meteorología. Gobierno de España. <http://www.aemet.es>
- Ander M, Meiswinkel R, Chirico J (2012) Seasonal dynamics of biting midges (Diptera: *Ceratopogonidae*: *Culicoides*), the potential vectors of bluetongue virus, in Sweden. *Veterinary Parasitology* 184: 59-67
- Borkent A (2005) The biting midges, the Ceratopogonidae (Diptera). In: Marquardt WC, Black WC IV, Freier JE, Hagedorn HH, Hemingway J, Higgs S, James AA, Kondratieff B, Moore CG (eds). *Biology of disease vectors*, 2 edition. Elsevier Academic Press, London
- Bram RA, George JE, Reichard RE, Tabachnick WJ (2002) Threat of foreign arthropod-borne pathogens to livestock in the United States. *Journal of Medical Entomology* 39(3):405-416
- Cagienard A, Griot C, Mellor PS, Denison E, Staerk KD (2006) Bluetongue vector species of *Culicoides* in Switzerland. *Medical and Veterinary Entomology* 20(2):239-247
- Calvete C, et al. (2008) Modelling the distributions and spatial coincidence of bluetongue vectors *Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus* group throughout the Iberian Peninsula. *Medical and Veterinary Entomology* 22: 124–134
- Campbell JA, Pelham-Clinton EC (1960) A taxonomie review of the British species of "*Culicoides*" Latreille (Diptera: *Ceratopogonidae*). *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 67:181-302

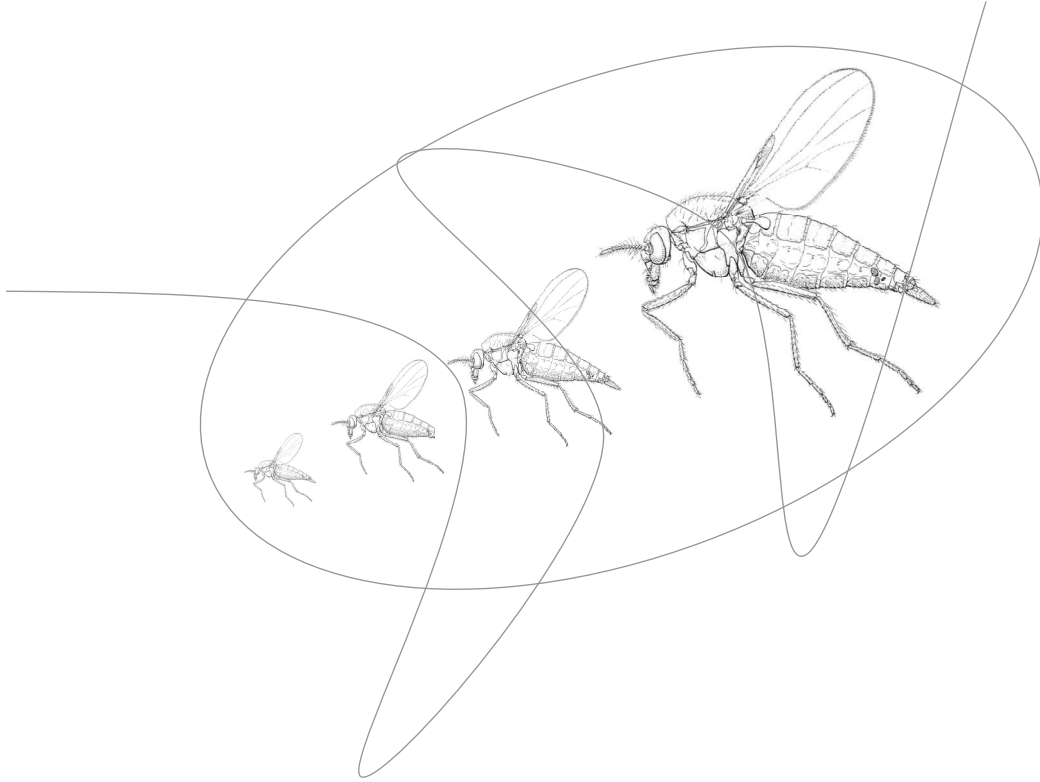
- Capela R, et al. (2003) Spatial distribution of *Culicoides* species in Portugal in relation to the transmission of African horse sickness and bluetongue viruses. *Medical and Veterinary Entomology* 17: 165-177
- Caracappa S, et al. (2003) Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Veterinary Record* 153(3):71-74
- Carpenter S, Lunt HL, Arav D, Venter GJ, Mellor PS (2006) Oral Susceptibility to Bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*) from the United Kingdom. *Journal of Medical Entomology* 43: 73-78
- Carpenter S, Szmaraagd C, Barber J, Labuschagne K, Gubbins S, Mellor P (2008) An assessment of *Culicoides* surveillance techniques in northern Europe: have we underestimated a potential bluetongue virus vector? *Journal of Applied Ecology* 45(4):1237-1245
- Delécolle, JC (1985) Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*) du nord-est de la France. DSc thesis, Université Louis Pasteur, Strasbourg
- Delécolle, JC (2002) *Ceratopogonidae* 26–33. In Carles-Tolrá Hjorth-Andersen, M, coord Catálogo de los Díptera de España, Portugal y Andorra (Insecta) Monografías de la Sociedad Entomológica Aragonesa, Zaragoza 8: 323-326
- Falconi C, et al. (2012) Evidence for BTV-4 circulation in free-ranging red deer (*Cervus elaphus*) in Cabañeros National Park, Spain. *Veterinary Microbiology In press*
- García-Bocanegra I, et al. (2011) Role of wild ruminants in the epidemiology of bluetongue virus serotypes 1, 4 and 8 in Spain. *Veterinary Research* 42: 88.
- Gerry AC, Monteys VSI, Vidal JOM, Francino O, Mullens BA (2009) Biting rates of *Culicoides* midges (Diptera: *Ceratopogonidae*) on sheep in northeastern Spain in relation to midge capture using uv light and carbon dioxide-baited traps. *Journal of Medical Entomology* 46(3):615-624
- Giménez B (1999) Madrid, Castilla – La Mancha. National Geographic Society, Barcelona
- Glukhova VM (1989) Blood-sucking midges of the genera *Culicoides* and *Forcipomyia* (*Ceratopogonidae*) Fauna of the USSR. Nauka, Leningrad
- Hoffmann B, et al. (2012) Novel *Orthobunyavirus* in cattle, Europe, 2011. *Emerging Infectious Diseases* 18: 469-472
- Jenks G (1967) The data model concept in statistical mapping. *International Yearbook of Cartography* 7: 186–190
- Jones KE, et al. (2008) Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990-994
- Kremer M (1965) Contribution a l'etude du genre *Culicoides* Latreille, particulièrement en France. *Encyclopedie Entomologique Paris Ser A* 39:1-299
- Linden A, et al. (2010) Bluetongue virus in wild deer, Belgium, 2005–2008. *Emerging Infectious Diseases* 16: 833-836
- López-Olvera JR, et al. (2010) Experimental infection of European red deer (*Cervus elaphus*) with bluetongue virus serotypes 1 and 8. *Veterinary Microbiology* 145: 148-152
- Lucientes J, Calvete C, Estrada R, Miranda MA, Del Rio R, Borrás D (2008) Los vectores de la lengua azul: conocimientos básicos de su bioecología. El Programa nacional de vigilancia entomológica de la lengua azul en España. XXXIII Jornadas Científicas y XXII Internacionales, Almería
- Maclachlan NJ (2010) Global implications of the recent emergence of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice* 26(1):163-172

- Meiswinkel R, Venter GJ, Nevill EM (2004) Vectors: *Culicoides* spp. In: Goetzer JAW, Tustin RC (eds) Infectious diseases of livestock. Oxford University Press, Oxford 1: 93-136
- Mellor PS, Boned J, Hamblin C, Graham S (1990) Isolations of African horse sickness virus from vector insects made during the 1988 epizootic in Spain. *Epidemiology and Infection* 105(2):447-454
- Mellor PS (2000) Replication of arboviruses in insect vectors. *Journal of Comparative Pathology* 123(4):231-247
- Miranda MA, Rincon C, Borrás D (2004) Seasonal abundance of *Culicoides imicola* and *C. obsoletus* in the Balearic islands. *Veterinaria Italiana* 40: 292-295
- Ninio C, Augot D, Delecolle JC, Dufour B, Depaquit J (2011) Contribution to the knowledge of *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*) host preferences in France. *Parasitology Research* 108(3):657-663
- Ortega MD, Mellor PS, Rawlings P, Pro MJ (1998) The seasonal and geographical distribution of *Culicoides imicola*, *C. pulicaris* group and *C. obsoletus* group biting midges in central and southern Spain. *Archives of virology Supplementum* 14:85-91
- Ortega MD, Holbrook FR, Lloyd JE (1999) Seasonal distribution and relationship to temperature and precipitation of the most abundant species of *Culicoides* in five provinces of Andalusia, Spain. *Journal of the American Mosquito Control Association* 15(3):391-399
- Purse BV, Brown HE, Harrup L, Mertens PPC, Rogers DJ (2008) Invasion of bluetongue and other orbivirus infections into Europe: the role of biological and climatic processes. *Revue Scientifique et Technique-Office International Des Epizooties* 27(2):427-442
- Randolph SE (2009) Tick-borne disease systems emerge from the shadows: the beauty lies in molecular detail, the message in epidemiology. *Parasitology* 136:1403-1413
- Rawlings P (1997) A key, based on wing patterns of biting midges (genus *Culicoides* Latreille - Diptera: *Ceratopogonidae*) in the Iberian Peninsula, for use in epidemiological studies. *Graellsia* 52:57-71
- RASVE (2012) Red de Alerta Sanitaria Veterinaria. Gobierno de España. <http://www.rasve.es>
- Rodríguez-Sánchez B, Gortázar C, Ruiz-Fons F, Sánchez-Vizcaino JM (2010) Bluetongue Virus Serotypes 1 and 4 in Red Deer, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 16(3):518-520
- Romón P, Higuera M, Delécolle JC, Baldet T, Aduriz G (2012) Phenology and attraction of potential *Culicoides* vectors of bluetonguevirus in Basque Country (northern Spain). *Veterinary Parasitology* 186:415-424
- Ruiz-Fons F, Reyes-García AR, Alcaide V, Gortázar C (2008a) Spatial and temporal evolution of bluetongue virus in wild ruminants, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 14(6):951-953
- Ruiz-Fons F, et al. (2008b). Epidemiological risk factors of Aujeszky's disease in wild boars (*Sus scrofa*) and domestic pigs in Spain. *European Journal of Wildlife Research* 54:549-555
- Ruiz-Fons F, Fernández-de-Mera IG, Acevedo P, Gortázar C, de la Fuente J (2012) Factors driving the abundance of *Ixodes ricinus* ticks and the prevalence of zoonotic *I. ricinus*-borne pathogens in natural foci. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 2669

- Sanchez-Vizcaino JM (2004) Control and eradication of African horse sickness with vaccine. In: Schudel ALM (ed) Control of infectious animal diseases by vaccination. *developments in biologicals* 119:255-258
- Sarto i Monteys V, Saiz-Ardanaz M (2003) *Culicoides* midges in Catalonia (Spain), with special reference to likely bluetongue virus vectors. *Medical and Veterinary Entomology* 17(3):288-293
- Szadziewski R, Borkent A (2007) Fauna Europaea, version 1.3. Available online at <http://www.faunaeur.org>
- Venter GJ, Labuschagne K, Hermanides KG, Boikanyo SNB, Majatladi DM, Morey L (2009) Comparison of the efficiency of five suction light traps under field conditions in South Africa for the collection of *Culicoides* species. *Veterinary Parasitology* 166(3):299-307
- Vicente J, et al. (2006) Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Veterinary Research* 37(1):107-119
- Ward AI (2005) Expanding ranges of wild and feral deer in Great Britain. *Mammal Review* 35(2):165-173
- Weaver SC, Reisen WK (2010) Present and future arboviral threats. *Antiviral Research* 85(2):328-345
- Zuur AF, Ieno EN, Elphick CS (2010) A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods and Ecology Evolution* 1:3–14

# Capítulo 4

---



## ***Leishmania infantum* phlebotomine sand fly vectors in Mediterranean continental areas of inland Iberian Peninsula: risks for public and animal health**

Mauricio Durán-Martínez, Ezio Ferroglio, Pelayo Acevedo, Anna Trisciuglio, Christian Gortázar, Stefania Zanet, Francisco Ruiz-Fons

(En preparación)





---

## **Flebótomos vectores de *Leishmania infantum* en zonas continentales mediterráneas del interior de la península ibérica: riesgos para la salud pública y la sanidad animal**

### **Resumen**

Los flebótomos son vectores de gran relevancia para numerosos patógenos en la cuenca mediterránea. *Leishmania infantum* – el agente causal de la leishmaniosis humana y canina en la cuenca mediterránea – es el patógeno transmitido por flebótomos más importante en esta zona. Sin embargo, la información sobre flebótomos en ciertas regiones de Europa es aún escasa y consecuentemente la capacidad de predicción y control de riesgos es difícil. Por ello, nuestro objetivo fue el de estudiar la presencia y distribución de flebótomos que puedan transmitir *L. infantum* y otros patógenos importantes en una región interior de España donde los patógenos transmitidos por flebótomos son endémicos. La captura de flebótomos se llevó a cabo en treinta y nueve localidades de cinco regiones climáticas en una zona mediterránea continental del centro-sur de España. Los flebótomos capturados fueron analizados por PCR para detectar la presencia de ADN de *L. infantum*. Posteriormente, se analizó la influencia de diferentes variables ecogeográficas – geografía, clima, hábitat y hospedadores – sobre la abundancia de la especie de flebótomo predominante mediante modelos estadísticos. Ciento cincuenta y dos flebótomos (142 *Phlebotomus perniciosus* y 10 *Ph. ariasi*) fueron capturados. Los análisis moleculares revelaron la presencia de ADN de *L. infantum* en grupos de flebótomos de dos localidades del sur y oeste de la región de estudio donde la abundancia de flebótomos fue más elevada. Los resultados estadísticos mostraron que la abundancia de *Ph. perniciosus* es más elevada en áreas agrícolas

templadas de la región, determinando con ello que el riesgo de patógenos transmitidos por flebótomos como *L. infantum* o el virus Toscana es mayor en esas zonas.

### **Abstract**

Phlebotomine sandflies are relevant vectors of several pathogens in the Mediterranean basin. *Leishmania infantum* – the causal agent of human and canine leishmaniasis in the Mediterranean basin – remains the most important of phlebotomine sand fly-borne pathogens in the area. However, information on phlebotomine sand flies in certain European regions remains scarce and consequently risk prediction and control are difficult. Thus, we aimed to determine the presence and distribution of phlebotomine sand flies that could vector *L. Infantum* and other relevant pathogens in a region of inland Spain where phlebotomine sand fly-borne pathogens are endemic. Trapping of phlebotomine sand flies was performed over thirty-nine points in five different climatic regions of a continental Mediterranean area in south-central Spain. A PCR was performed over pools of the captured species to search for the presence of *L. Infantum* DNA. Later on, the effect of different ecogeographical variables – geography, climate, habitat and hosts - over the abundance of the predominant species was analyzed by statistical modelling. One hundred and fifty-two phlebotomine sand flies (142 *Phlebotomus perniciosus* and 10 *Ph. ariasi*) were captured. Molecular analyses revealed the presence of *L. Infantum* DNA in pools from two locations in the south and west of the study region where phlebotomine sand fly abundance was found higher. Model results showed that the abundance of *Ph. perniciosus* is expected to be higher in temperate agricultural areas within the study region, determining that risks of phlebotomine sand fly-borne pathogens such as *L. Infantum* or Toscana virus are higher in these areas.

## Introduction

Phlebotomines are diptera of the family *Psychodidae*; subfamily *Phlebotominae*, also known as sand flies. Globally, near 1,000 species are reported; 408 species in the New World and 428 in the Old World (Munstermann 2004). There is scarce knowledge on the biology of phlebotomines - the complete life-cycle is only known for the 5% of species (Munstermann 2004). Phlebotomines breed in wet soils with organic matter (Killick-Kendrick 1987). Males and females feed on honeydew secreted by aphids (Killick-Kendrick 1987). However, to maturate eggs, females need ingesting blood and then require feeding on vertebrate hosts (Rioux et al. 1969; Killick-Kendrick 1999). Selection of hosts seems to be related to availability rather than to specific host-parasite relationships (De Colmenares et al. 1995; Bongiorno et al. 2003) although some species may be attracted by particular species – e.g. *Sergentomyia minuta* that feeds on cool-blooded animals (Baron et al. 2011).

In Spain 12 species of sand flies have been reported: ten belong to the genus *Phlebotomus* – *Ph. perniciosus*, *Ph. ariasi*, *Ph. papatasi*, *Ph. langeroni*, *Ph. sergenti*, *Ph. mascitti*, *Ph. longicuspis*, *Ph. fortunatarum*, *Ph. alexandri* and *Ph. chabaudi* – and two to the genus *Sergentomyia* – *S. minuta* and *S. fallax* (Gil-Collado et al. 1989; Gállego-Berenguer et al. 1992; Conesa-Gállego et al. 1999). The most abundant species in peninsular Spain is *S. minuta* followed by *Ph. perniciosus* and *Ph. ariasi* (reviewed by Gálvez et al. 2010), but their predominance at local geographical scales may vary according to environmental factors (Aransay et al. 2004).

*Ph. perniciosus* and *Ph. ariasi* are the most important phlebotomine sand flies in the western Mediterranean from a public and animal health point of view because both are major vectors of *Leishmania infantum*, the causal agent of endemic leishmaniasis in the Mediterranean basin (Rioux et al. 1986; Martín- Sánchez et al. 1994). Leishmaniasis

is a disease of mammals caused by *Leishmania* spp., a genus of parasitic protozoa including more than 30 species present in more than 80 countries (Munstermann 2004). Endemic entities of human leishmaniasis in southern Europe are mainly caused by visceral leishmaniasis and sporadic cutaneous leishmaniasis due to *L. infantum* (Depaquit et al. 2010). Cutaneous leishmaniasis due to *L. tropica* has been only reported in Greece (Gramiccia and Gradoni 2007) and northern Africa (Hotez et al. 2012) in the Mediterranean basin but Spanish public health authorities need to carefully consider *L. tropica*, *L. major* and *L. donovani* as potential future health threats (Ready 2010). The number of cases of human leishmaniasis in southern Europe between 1996 and 2005 reached up 1,677 cases in Italy, 1,148 in Albania and 945 in Spain (Gramiccia and Gradoni 2007). Up to date, only *L. infantum* has been reported in Spain as the agent of endemic cutaneous and visceral leishmaniasis (Gramiccia and Gradoni 2007) and has been implicated in more than 260 human cases of leishmaniasis in the metropolitan area of Madrid since 2009 (Promed 2012).

*Phlebotomus* spp. are also important vectors for different viruses in the *Phlebotomus* genus – family *Bunyaviridae* – of which Toscana virus (TOSV) is the most important in the western Mediterranean basin (Charrel et al. 2007). *Ph. perniciosus* may be a potential reservoir of TOSV because transovarial transmission has been found to be an important way of viral persistence. Spain seems to be endemic for TOSV (Charrel et al. 2005) which accounts for near the 6% of reported aseptic meningitis human cases (De Ory et al. 2009).

The particular risk of phlebotomine transmitted diseases to which peninsular Spain is exposed in addition to the need of improving information on the distribution and abundance of phlebotomine sand flies in Spain led us to promote this study. The region of study, the autonomous community of Castilla – La Mancha (CLM) has the

second regional rate of hospitalization due to human leishmaniasis in Spain with an incidence of 1.1 per 100,000 inhabitants (Valcárcel et al. 2008), showing the potential of the region for the vectors of *L. infantum*. Additionally, wild mammals – mainly wild ungulates – have experienced a notable increase in density in the Iberian Peninsula during the last three decades (Acevedo et al. 2007, 2008), suggesting that the availability of hosts for phlebotomine sand flies has increased and could have perhaps influenced their population dynamics. However, information on the geographic distribution, community composition and pathogen prevalence in phlebotomine sand flies in this continental Mediterranean region is scarce in spite it would be crucial to reduce current health associated risks and preventing future threats of sand fly-borne pathogens.

## **Material and methods**

### *Sampling site selection and phlebotomine survey*

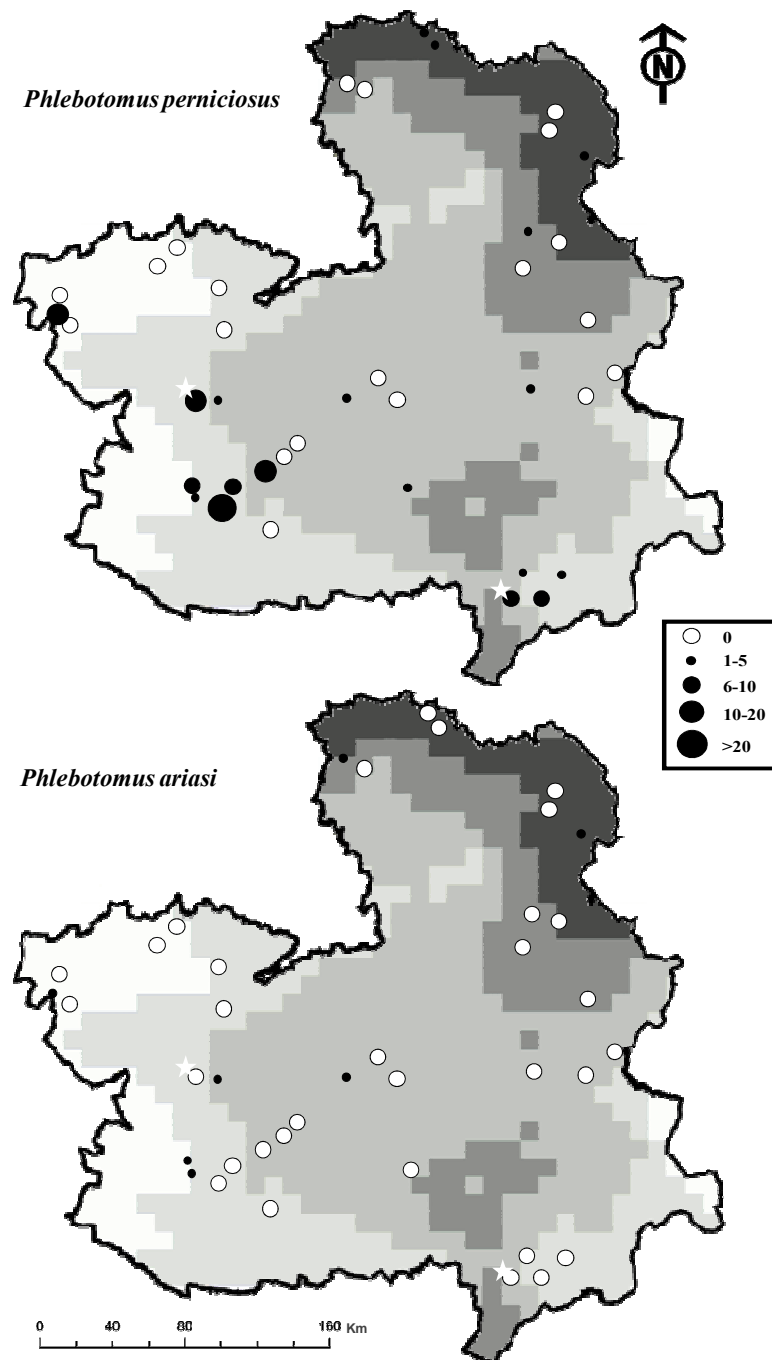
Castilla – La Mancha is located in south-central Spain and extends over 79,463 km<sup>2</sup>, constituting 15.7% of mainland Spain. The region is a broad plateau with altitudes from 600 to 1,000 m surrounded by different mountain ranges. The region is dominated by a continental Mediterranean climate that determines extreme temperature ranges (cold winters and very hot summers) and rainfall ranges between 300 and 700 mm with large seasonal contrasts (Giménez 1999).

In order to stratify the study area according to climatic differences, each of the 905 UTM 10x10 km squares in CLM were characterized by 27 climatic and spatial variables (Table 1). A Principal Component Analysis (PCA) was performed over these variables and the first factor retained from the PCA was used to climatically regionalize the study area. The values of the first factor were classified by using Jenks Natural

Breaks Classification method (Jenks 1967). This method optimizes the classification of continuous data into discrete categories by reducing the variance within each class while maximizing the variance between classes. This analysis divided the study region into five different climatic regions (Fig. 1). For the phlebotomine study a number of sites were selected from each climatic region proportionally to their extension within CLM. Site selection was performed according to the presence of water bodies (lagoons, rivers or streams) that could enhance moisture conditions needed by phlebotomine sand flies for reproduction. A total of 39 sampling points were finally selected in the region.

The survey of phlebotomine sand flies was conducted in three different times along a year between 2009 and 2010: autumn (Oct-Nov), spring-summer (May-July) and summer-autumn (Aug-Sep). Surveys were not performed during the winter time because the activity period of phlebotomine sand flies in Spain extends from spring to autumn (Gálvez et al. 2010). For phlebotomine collection, trap capture stations were placed in every site and period from dusk to dawn (approximately from 8:00 pm to 8:00 am) during one night. A capture station consisted in three Centers for Disease Control (CDC) traps– "Mosquito Light Trap" (Mod2504 *CurtisDyna-FogUS*®, Westfield, USA), two of them equipped with a white light lamp and one equipped with an ultraviolet light. Traps were hung to allow the light source to remain at a height of 1.5 m from the ground (Shin et al. 2005). Each of the traps in a capture station was placed at a minimum distance of 20 m to avoid interferences with the rest. Traps were checked at dawn, the basket catch withdrew and the captured insects placed in coolers with dry ice for euthanasia. Once dead, insects were placed in 50 ml labelled containers, preserved in ice during transport and stored frozen at -20° C. Phlebotomines were quantified, sexed and taxonomically identified to the species level (Gil Collado et al. 1989; Gállego Berenguer et al. 1992).

**Figure 1.** Maps of the study region showing the geographic distribution and abundance of *Phlebotomus perniciosus* and *Ph. ariasi*. Climatic regions 1 to 5 are represented by decreasing intensity in grey colour within the map (from dark grey for region 1 to white for region 5). White stars in maps indicate sites where phlebotomine sand fly pools tested positive to *L. infantum* DNA.



For identification each individual was cleared in potassium hydroxide and Marc Andre solution and slide-mounted in Berlese's fluid for microscopic diagnosis (Léger et al. 1983).

### *Molecular analyses*

For molecular analyses, 22 pools of 3 *Ph. perniciosus* and 1 pool of *Ph. perniciosus* (n=1) and *Ph. ariasi* (n=2) from different sampling sites within the study area were processed. For total genomic DNA extraction from pools a commercial kit was employed (GenomeElute, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) following the procedures suggested by the manufacturer. Later on, an adaptation of a previously described PCR protocol (Lachaud et al., 2002) targetting a 145-bp fragment present on the high copy of kDNA minicircles of *L. infatum* was performed as previously described (Sobrinho et al. 2008). Briefly, PCR uses the primers RV1 (5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3') and RV2 (5'-CACCTGGCCTATTTTACACCA-3'). For all reactions, 12.5 µl of Amplitaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA), 0.25 µl of each primer (100 µM) and 2.5 µl of DNA sample were used in a total reaction volume of 25 µl. Conditions of the PCR consisted on an initial annealing at 94°C for 2 min, 45 cycles of 94°C for 1 min, 62°C for 1.5 min, 70°C for 45 s (increase of 5 s for each cycle), followed by a final elongation at 70°C for 10 min in an iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad). PCR fragment size was estimated by comparing with two molecular weight standards: PCR 100 pb Low Ladder and pBR 322 HaeIII Digest (Sigma-Aldrich) after electrophoresis on a 2% agarose gel. Gels were stained with Gel Red kit Nucleic Acid Gel Stain (Biotum. Hayward. CA. USA) under the conditions suggested by the manufacturer and photographed on a Gel-Doc System (Bio-Rad).



**Table 1.** Environmental variables gathered for each of the 905 10x10 km UTM squares of the study region and their relation with the first factor obtained from the principal component analysis (PCA). The mean value of every variable in each climatic region obtained with the PCA factor (see text and Figure 1) and its associated standard error (within brackets) are also shown.

Variable	Factor	Bioclimatic region				
		1	2	3	4	5
Longitude (m) <sup>1</sup>	-0.321	56.5 (0.6)	55. (0.3)6	52.1 (0.3)	47.1 (0.7)	38.9 (0.9)
Latitude (m) <sup>1</sup>	-0.652	452.0 (0.4)	441.2 (0.9)	437.4 (0.4)	433.9 (0.5)	435.9 (0.6)
Difference in altitude (m)	-0.407	368.2 (20.1)	331.5 (16.7)	198.6 (9.4)	317.2 (12.4)	293.2 (12.4)
Mean annual no. of days with hail <sup>2</sup>	-0.518	4.3 (0.2)	3.5 (0.1)	2.9 (0.1)	2.4 (0.1)	2.9 (0.1)
Mean annual no. of frost days <sup>2</sup>	-0.760	105.3 (0.7)	79.5 (1.1)	69.5 (0.4)	51.1 (0.9)	36.8 (0.6)
Mean annual no. of days with precipitation >0.1mm <sup>2</sup>	-0.599	79.0 (1.9)	70.1 (1.2)	61.8 (0.5)	58.1 (0.9)	61.1 (0.8)
Mean annual no. of foggy days <sup>2</sup>	-0.792	18.0 (0.7)	12.4 (0.6)	4.2 (0.1)	2.0 (0.1)	1.1 (0.1)
Runoff (mm)	-0.484	158.9 (13.1)	148.1 (8.8)	60.4 (4.4)	77.8 (5.8)	154.0 (10.9)
Average annual potential evapotranspiration (mm) <sup>2</sup>	0.856	654.0 (2.8)	733.5 (3.9)	786.7 (2.0)	818.5 (2.2)	850.2 (3.6)
Average annual actual evapotranspiration (mm)	-0.549	573.3 (8.2)	595.8 (8.7)	461.3 (4.9)	467.0 (6.5)	609.4 (10.5)
Mean relative air humidity in January (HUI; %) <sup>2</sup>	0.424	87.0 (0.2)	88.2 (0.2)	90.4 (0.1)	88.6 (0.2)	89.3 (0.3)
Mean relative air humidity in July (HUJU; %) <sup>2</sup>	-0.534	70.6 (0.3)	65.5 (0.5)	63.2 (0.2)	62.2 (0.3)	62.7 (0.6)
Continentality index <sup>2, 3</sup>	0.235	21.6 (0.9)	26.1 (0.8)	29.0 (0.5)	29.1 (0.6)	28.5 (0.7)
Moisture Index <sup>2, 4</sup>	-0.593	88.3 (3.2)	73.1 (2.6)	56.2 (1.1)	52.4 (1.4)	62.5 (2.0)
Mean annual insolation (hours year <sup>-1</sup> ) <sup>2, 5</sup>	0.857	24.8 (0.1)	27.5 (0.1)	28.9 (0.0)	28.7 (0.0)	29.3 (6.9)
Rainfall regularity	0.286	28.7 (0.2)	30.9 (0.2)	30.9 (0.1)	30.8 (0.1)	30.0 (0.1)
Slope (degrees)	-0.444	3.0 (0.2)	2.8 (0.2)	1.5 (0.1)	2.4 (0.1)	2.3 (0.1)
Soil permeability	0.066	2.4 (0.1)	2.5 (0.1)	2.5 (0.0)	2.0 (0.1)	2.0 (0.1)
Average annual accumulated precipitation (P; mm) <sup>2</sup>	-0.647	684.1 (22.6)	621.8 (12.3)	464.0 (5.7)	473.4 (8.6)	621.1 (13.1)
Average annual maximum precipitation in 24 hours (PM24; mm) <sup>2</sup>	0.123	93.4 (1.9)	100.9 (2.3)	102.3 (1.6)	134.8 (2.8)	151.5 (4.8)
Average annual relative maximum precipitation (P/PM24)	0.460	0.1 (0.0)	0.2 (0.0)	0.2 (0.0)	0.3 (0.0)	0.3 (0.0)
Average annual solar radiation (Kwh m <sup>-2</sup> day <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	0.731	441.2 (1.4)	471.3 (1.4)	479.3 (0.5)	476.7 (0.5)	472.1 (0.6)
Mean temperature in January (TEJ; °C) <sup>2</sup>	0.876	0.8 (0.1)	3.3 (0.1)	4.5 (0.0)	5.3 (0.1)	6.1 (0.1)
Mean temperature in July (TEJU; °C) <sup>2</sup>	0.909	19.7 (0.1)	21.8 (0.1)	24.0 (0.1)	24.5 (0.1)	25.3 (0.1)
Average annual mean temperature (°C) <sup>2</sup>	0.906	9.5 (0.1)	11.7 (0.1)	13.5 (0.1)	14.2 (0.1)	14.9 (0.1)
Average annual air humidity range (HUI-HUJU; %)	0.715	16.4 (0.3)	22.7 (0.5)	27.2 (0.2)	26.5 (0.2)	26.6 (0.5)
Average annual temperature range (TEJU-TEJ; %)	0.354	18.9 (0.1)	18.6 (0.1)	19.5 (0.1)	19.2 (0.1)	19.1 (0.1)

*Ecogeographical variables*

The abundance of an arthropod vector species in a specific place at a given time depends on different environmental and geographical present and past conditions (Randolph 2009; Ruiz-Fons et al. 2012). As one of our aims intended to understand which of these conditions determined phlebotomine abundance in the study area, a number of ecogeographical covariables that a priori could influence phlebotomine reproduction, survival and activity according to existing literature (Munstermann 2004; Barón et al. 2011) were gathered for each of the study sites. These variables were grouped in 4 different factors as follows: i) geography (4 variables); ii) climate (14 variables); iii) habitat (1 variable); and iv) hosts (14 variables). The variables and their descriptive values for our study sites are summarized in Table 2.

Geographic variables: Longitude and latitude were recorded with portable GPS devices. Spatial location may account for spatial trends in species distribution that may be associated to population dynamics and consequently to species abundance (Real et al. 2003).

Climatic variables: Daily series data from 152 meteorological stations in CLM from 2008 to 2010 were provided by the Spanish National Meteorological Agency (Aemet 2011). Temperature, relative humidity, accumulated precipitation and wind speed variables at different time scales were calculated in relation to sampling date using data from the meteorological station that was closer to the sampling point (Table 2). Temperature and relative humidity data were used to calculate vapour pressure deficit (VPD). VPD is linearly related to the rate of evapotranspiration and consequently is a measure of the hydric stress to which phlebotomines are exposed. VPD was calculated as the difference between water vapour saturation pressure (VSP) and water vapour

**Table 2.** Relationship between biogeographical variables in each of the four factors considered for statistical analyses and the abundance of *Ph. perniciosus*. The Spearman correlation coefficient ( $\rho$ ) or chi-square value ( $\chi^2$ ), the significance value ( $p$ ), the arithmetic mean and its associated standard error as well as value ranges for continuous predictor variables are shown. Variables that were selected for multivariate modelling are marked with an asterisk.

Environmental Factor	Variable code	Variable description	$\rho/\chi^2$	$p$	Mean (SE)	Range
Geography	Lo*	Longitude (m/10 <sup>3</sup> )	-0.018	0.856	482.5 (8.7)	314.1-627.6
	La*	Latitude (m/10 <sup>4</sup> )	-0.226	<0.05	439.2 (0.9)	425.2-456.6
Climate	Alt*	Altitude (m)	-0.004	0.964	743.0 (24.8)	324.0-1416.0
	Cr*	Climatic region (categorical)	0.076	0.441	---	---
	T	Mean temperature of sampling day (°C)	0.512	<0.001	17.4 (0.5)	2.6-29.0
	Tm	Average mean temperature 30 days bs <sup>1</sup> (°C)	0.568	<0.001	18.8 (0.4)	11.9-28.6
	Ts	Average mean temperature 180 days bs (°C)	0.176	0.074	16.1 (0.6)	6.1-25.5
	Tan*	Average mean temperature 365 days bs (°C)	0.062	0.532	14.6 (0.2)	10.2-16.7
	Tw	Average winter mean temperature (°C)	0.022	0.826	6.1 (0.2)	2.9-8.4
	Pm	Accumulated precipitation in 30 days bs (mm)	-0.222	0.024	39.4 (2.0)	4.3-90.3
	Pt	Accumulated precipitation in 90 days bs (mm)	-0.132	0.183	127.7 (8.0)	13.4-339.4
	Ps	Accumulated precipitation in 180 days bs (mm)	0.063	0.523	309.1 (18.7)	52.1-768.5
	Pan*	Accumulated precipitation in 365 days bs (mm)	0.279	<0.01	593.8 (19.0)	281.3-1123.6
	RH*	Mean relative humidity of the sampling day (%)	-0.221	0.024	59.2 (1.2)	32.5-92.5
	RHm	Average relative humidity of 30 days bs (%)	-0.222	0.024	57.3 (1.2)	13.0-86.0
	VSD	Water vapour saturation deficit (mm)	0.457	<0.001	878.1 (44.2)	105.1-2321.3
	VSDm*	Water vapour saturation deficit for 30 days bs (mm)	0.456	<0.001	1037.9 (50.8)	237.0-2578.8
	Ws*	Average wind speed of the sampling day (Km/h)	-0.101	0.307	5.5 (0.4)	0.0-22.2
	Habitat	Veg*	Vegetation type (categorical)	0.001	0.995	---
Hosts	Rd_fav	Favourability for red deer	0.110	0.265	0.617 (0.017)	0.270-0.889
	Rod_fav	Favourability for roe deer	0.034	0.730	0.473 (0.022)	0.087-0.928
	Wb_fav	Favourability for wild boar	-0.025	0.804	0.505 (0.017)	0.125-0.758
	Wu_fav*	Favourability for wild ungulates	0.016	0.870	0.532 (0.014)	0.265-0.795
	Do	Density of sheep in the municipality (n°/Ha)	0.073	0.460	1.191 (0.590)	0.000-35.941
	Db	Density of cattle in the municipality (n°/Ha)	0.07	0.479	0.184 (0.047)	0.000-2.173
	Dc	Density of goats in the municipality (n°/Ha)	0.08	0.421	0.081 (0.030)	0.000-1.780
	Do_f	Density of sheep farms in the municipality (n°/Ha)	0.07	0.479	0.012 (0.096)	0.000-1.000
	Db_f	Density of cattle farms in the municipality (n°/Ha)	0.08	0.421	0.001 (0.000)	0.000-0.014
	Dc_f	Density of goat farms in the municipality (n°/Ha)	0.08	0.419	0.002 (0.000)	0.000-0.003
	Drum	Density of ruminants in the municipality (n°/Ha)	0.111	0.261	1.457 (0.626)	0.000-38.169
	Drum_f*	Density of ruminant farms in the municipality (n°/Ha)	0.145	0.141	0.004 (0.001)	0.000-0.087
	Dt*	Distance to the nearest town (Km)	0.03	0.36	2.49 (0.29)	0.00-11.80
	Pd*	Human population density in the municipality (n°/Km <sup>2</sup> )	-0.028	0.775	40.08 (7.53)	0.71-358.90

<sup>1</sup> bs: before sampling

pressure (VP). VSP was calculated according to the Keenan and Keyes formula (<http://ecaaser3.ecaa.ntu.edu.tw/weifang/ebook/psy-data1998.pdf>):

$$\ln(VSP/R) = \frac{A + BT + CT^2 + DT^3 + ET}{FT + GT^2}$$

where  $R=22105649.25$ ,  $A=-27405.526$ ,  $B=97.5413$ ,  $C=-0.146244$ ,  $D=0.12558 \times 10^{-3}$ ,  $E=-0.48502 \times 10^{-7}$ ,  $F=4.34903$ ,  $G=0.39381 \times 10^{-2}$  and T is temperature in K. VP was calculated as:

$$VP = \frac{VSP \times RH}{100}$$

where RH is the relative humidity in percentage. Climatic region was considered as a measure of spatial variation in environmental conditions while altitude was included as a indirect measure of climatic variation due to variations in altitude within similar climatic sites.

Habitat variables: Habitat type and composition may significantly modulate the environmental favourability for phlebotomine sand flies reproduction and survival (Barón et al. 2011). Phlebotomine individual ranging area does not usually exceed from 60 m away reproduction sites (Munstermann 2004), for which habitat type was recorded at the sampling site level (within 50m radius from the sampling point). For analytical purposes, habitat was grossly classified in three different classes: i) typical Mediterranean habitat – evergreen oak (*Quercus ilex*) or pine (*Pinus* spp.) forests mixed with Mediterranean scrubland; ii) agricultural habitat – mainly seasonal cereal plantations and vineyards mixed with scattered patches of olive trees; and iii) predominance of riparian forest or marshland vegetation.

Host related variables: Only *Ph. perniciosus* capture data was adequate enough for statistical modelling purposes. *Ph. perniciosus* females feed mainly on mammal hosts (De Colmenares et al. 1995) and thus only mammal abundance variables were

considered as possible environmental drivers of *Ph. perniciosus* abundance. The number of cattle, sheep and goat and the number of farms in 2007 at the municipality level were provided by the regional animal health authorities. Data were used to calculate the density of ruminants and ruminant farms per hectare at the municipality level. The availability of wild ungulate hosts (named red deer *Cervus elaphus*, roe deer *Capreolus capreolus* and Eurasian wild boar *Sus scrofa*) was quantified on the basis of their environmental favourability which was produced in the context of a Spanish epidemiological study focused on *C. imicola* abundance (details of the functions can be obtained in Acevedo et al. 2010). Finally, the availability of human hosts was measured as the population density at the municipality level – inhabitants per square kilometre – according to demographic statistics obtained from the Spanish National Statistics Institute (<http://www.ine.es>). An additional proxy of human availability was measured by the distance from the sampling point to the nearest town that was obtained by using geographic information systems.

### *Statistical analyses*

Phlebotomine abundance index for every species captured was calculated per sampling site and period as the number of captures per trap station. However, the low number of captures of *Ph. ariasi* did not allow performing statistical modelling with the predictor ecogeographical variables. Thus, only the abundance of *Ph. perniciosus* was considered for statistical analyses.

First, the correlation matrix of variables in the climate and host abundance factors – those with higher number of variables – was calculated to establish the relationships between variables grouped within the same factor. The relationship between continuous and categorical variables was established by Kruskal-Wallis tests.

Later on, a variable reduction procedure was performed in order to select non-highly correlated variables from each factor in order to avoid multicollinearity in the statistical modelling analysis. Variable selection procedure was carried out by performing Spearman correlation tests between each predictor variable (or Kruskal-Wallis tests for categorical predictors) and the response variable – i.e. the abundance of *Ph. perniciosus* (Table 2). Only predictors significantly related to the response variable were included in the multivariate analyses (e.g. see Ruiz-Fons et al. 2008). When highly correlated predictors ( $\rho > 0.5$ ) were statistically linked to the response variable ( $p < 0.05$ ), only the most meaningful predictor was included in the next stage (Table 2). Finally, generalized mixed linear models (Zuur et al. 2009) were developed to determine the influence of any predictor on the abundance of *Ph. perniciosus* using a binomial negative distribution, a logarithmic link function and considering sampling site as a random variable. Modelling was carried out by a forward stepwise procedure in order of downhill Akaike information criterion (AIC; Akaike 1974). Modelling stopped when no decreases in the AIC was observed. Statistical analyses were carried out with the IBM-SPSS 19.0 Statistical Package software (IBM. Corporation. New York. USA).

## Results

During the survey, 152 phlebotomine sand flies were collected; 142 *Ph.* (Larrousius) *perniciosus* Newstead, 1911 (93.4%) and 10 *Ph.* (L.) *ariasi* Tonnoir, 1921 (6.6%). Sex allocation of captured phlebotomines was 72 females (47.3%) and 80 males (52.6%). Differences in mean phlebotomine capture of white compared to ultraviolet light traps – corrected according to the number of each trap type per trap station - were minimal (0.48 and 0.50 phlebotomines per night and period, respectively). The major part of phlebotomines were captured during the summer-autumn 2010 sampling period (n=101;

66.4%) in contrast to the spring-autumn 2010 period (n=51; 33.6%) and the autumn 2009 period (n=0, 0.0%). Mean number of phlebotomine sand flies captured per night and trap station according to climatic region (Fig. 1) were higher in region 4 ( $2.7\pm 1.4$ ), followed by regions 5 ( $1.7\pm 1.2$ ), 3 ( $1.3\pm 0.5$ ), 1 ( $0.4\pm 0.2$ ) and 2 ( $0.4\pm 0.3$ ).

Molecular analyses of phlebotomine sandflies revealed the presence of *L. infantum* in the study sites although positive samples were only obtained from two sampling sites in southern CLM, coinciding with areas where the number of sites positive for *Ph. perniciosus* presence was high (Fig. 1).

Variables included in the final model that significantly influenced the abundance of *Ph. perniciosus* were habitat type and mean annual temperature. Agricultural landscapes showed significantly higher potential to harbour higher *Ph. perniciosus* abundances (IRR=9.1; CI 2.1-39.3) than Mediterranean and riparian habitats (Table 3). Annual and winter mean temperature – calculated as the average of daily mean temperature values from December, 22<sup>nd</sup> to March, 21<sup>st</sup> – were highly correlated ( $\rho=0.843$ ,  $p<0.001$ ), showing that temperate locations in which winter severity is moderate have a significantly higher risk of having higher *Ph. perniciosus* abundance (IRR=2.13; CI 1.18-3.84). Model results showed that the abundance of *Ph. perniciosus* is expected to be higher in temperate agricultural areas within the study region, which are mainly those in south and south-western parts of CLM – climatic regions 3 and 4 in Fig. 1.

**Table 3.** Results of the final statistical model for the abundance of *Ph. perniciosus* showing the statistic (F), the incidence rate ratio (IRR) and its associated standard error (SE), the 95% confidence interval (CI) and the significance value (p) for each of the variables included in the model. Abbreviations are drawn according to Table 1.

Variable	F	IRR	SE	p	95% CI
<i>Intercept</i>	2.276	$2.61 \times 10^{-6}$	375.03	<0.05	---
<i>Sampling period</i>	1.234				
Autumn		-0.52	1.62	0.183	0.20-1.36
Spring-Summer		-0.54	1.60	0.187	0.21-1.36
Summer-Autumn		Ref	---	---	---
<i>Habitat</i>	5.170				
Mediterranean		3.92	2.19	0.084	0.83-9.89
Agricultural		9.12	2.09	<0.05	2.11-39.33
Riparian		Ref	---	---	---
<i>Climate region</i>	0.949				
Region 1		9.35	5.37	0.187	0.33-262.96
Region 2		3.01	3.19	0.343	0.30-29.99
Region 3		3.67	2.29	0.121	0.70-19.05
Region 4		1.11	2.04	0.883	0.27-4.58
Region 5		Ref	---	---	---
Wu_f	0.047	1.55	7.51	0.829	0.03-84.78
Tan	6.506	2.13	1.35	<0.05	1.18-3.84
Drum_f	0.021	-0.11	6563273.20	0.886	$3.01 \times 10^{-15}$ - $3.62 \times 10^{-12}$

## Discussion

Information obtained in this study shows that the most relevant phlebotomine species from a public and animal health perspective in Spain – *Ph. perniciosus* and *Ph. ariasi* – are present in the study region with higher abundances in moderate temperate climatic regions in contrast to cooler regions. The finding of positive phlebotomines for *L. Infantum* coincided with climatic areas displaying the higher abundance of phlebotomine sand flies in the study area (Fig. 1), confirming the potential of these areas for sand fly-borne pathogens as already reported through incidence of human and canine cases of leishmaniasis (Castañeda et al. 1999; Valcárcel et al. 2008).



*Methodological considerations*

Our aim was to outline the abundance of phlebotomine sand flies in different climatic regions within the study area and hence sampling sites were selected without considering any favourable trait for phlebotomine sand flies other than proximity of wet soils. This approach intended to provide a reasonable perspective of the risk in different environments (natural, rural and peri-urban) in the study region, not biasing our findings to more favourable reproduction and resting sites. Former approaches to the composition and density of phlebotomine sand flies in peninsular Spain were carried out by considering only favourable reproduction or resting sites; for example Gálvez et al. (2010) and Barón et al. (2011) placed sticky traps inside holes that provide an adequate microclimate for diurnal resting sites, while Aransay et al. (2004) placed CDC traps inside or outside livestock farms and houses. May be the first bias of our survey was that sampling sites were not placed within a short distance from a livestock farm or a highly populated area. Munstermann (2004) reported that *Phlebotomus* spp. are found at high densities near larval habitats where soil moisture and concentration of domestic animal faecal material favour reproduction. Our results could perhaps bias the perspectives of abundance of phlebotomine sand flies in the study region because no highly favourable sites were considered for the survey.

A second bias could have perhaps been the selection of CDC light traps instead of sticky traps. Sticky traps are suitable for standard monitoring of sand flies (Alexander and Maroli 2003; Faiman et al. 2009) although they have been reported to be limited by their surface area and to show a male bias (Kaul et al. 1994). CDC light traps were initially designed for mosquito surveillance but they have been proven to be also efficient for capturing sand flies; Maroli et al. (1994) reported that CDC light traps were more effective to collect the predominant Italian phlebotomine species than sticky traps,

and Hilmy et al. (1989) found that CDC light traps were the most efficient in capturing species of the genus *Phlebotomus* in Egypt. Independently of their efficiency, our capture method would have not efficiently measured the diversity of phlebotomine species in the study area because species that are not attracted by lights or that feed on ground hosts – e.g. *S. minuta* – would have been missed.

Finally, we planned survey dates according to the activity period of the most important *Phlebotomus* spp. in Spain attending to previous findings (Gálvez et al. 2010). Long-term series data on vector abundance are desirable for ecological studies, but punctual well-balanced surveys carried out within the main activity period of the vector may also be representative of abundance at regional and local scales (Ruiz-Fons et al. 2012) Thus, we expect that our survey approach would have properly estimated the abundance of *Ph. perniciosus* and *Ph. ariasi* in the study sites.

#### *Phlebotomine abundance and ecogeographical drivers*

Aransay et al. (2004) reported that *Ph. perniciosus* accounted for the 33.8% of the captures while *Ph. ariasi* represented the 2.6% of captures in north-eastern Spain and Barón et al. (2011) reported similar findings in southern Spain. The higher abundance of *Ph. perniciosus* in CLM is probably due to its higher environmental adaptability for what it is classified as a plastic species (Munstermann 2004). This seems to be confirmed by the fact that *Ph. perniciosus* was captured in each of the five climatic regions within CLM. However, mean abundance was higher in warm than in cool regions (Table 1; Fig. 1) suggesting a constraint exerted by cool Mediterranean climates in agreement to reports in southern and northeastern Spain (Aransay et al. 2004; Barón et al. 2011).

In contrast to *Ph. perniciosus*, *Ph. ariasi* presented a lower distribution within the study region and the number of captures was low in any of the sites where it was

present. Interestingly, *Ph. ariasi* was not only restricted to the coolest climatic regions in the study area (Fig. 1) as expected according to the literature (Aransay et al. 2004; Gálvez et al. 2010). Nonetheless, *Ph. ariasi* is present during the whole year in thermo-Mediterranean regions of southeastern Spain (Martínez Ortega and Conesa Gallego 1987) indicating that it is also well adapted to coexist with *Ph. perniciosus*.

Temperature and precipitation define sand fly survival as well as the speed of development of the different stages of its life cycle (El-naïem et al. 1998; Killick-Kendrick 1999; Gage et al. 2008). According to El-Badry et al. (2008), *Plebotomus* spp. adults and larvae are sensitive to high temperatures and low humidity. However, within a continental Mediterranean region, the higher the annual mean temperature the higher the abundance of *Ph. perniciosus*, contrasting with the negative relationship observed in sub-tropical climates. The proportional relationship between annual mean temperature and winter temperature suggests that the later may be responsible for *Ph. perniciosus* abundance. Under temperate continental climatic conditions, winter severity may impair survival of overwintering stages and consequently condition abundance the following year. *Ph. perniciosus* is described as a xerophilic species (Colacicco-Mayhugh et al. 2010; Barón et al. 2011), which greatly agrees with the higher abundance observed in climatic regions 3 and 4 that are among the driest areas within the study region (see annual accumulated precipitation in Table 1). Barón et al. (2011) found that riparian habitats and deciduous forests are less favourable for *Ph. perniciosus* in southern Spain than agricultural areas with olive trees and scrub vegetation. This observation agrees with the finding that higher *Ph. perniciosus* abundance is found in agricultural areas in CLM, showing the potential of these areas to maintain this important vector species. However, in contrast to what Barón et al. (2011) observed in southern Spain, we found no direct evidence of urban settlements having any role on the abundance of *Ph.*

*perniciosus* (Table 3). In fact, one of the points with higher abundance was located in the outskirts of an agricultural village. Altogether, climate and habitat clearly define the potential favourability of southern and southwestern regions in CLM for *Ph. perniciosus*.

#### *Public and animal health risks*

*Ph. perniciosus* and *Ph. ariasi* are proven vectors of *L. infantum* in the Iberian Peninsula (Rioux et al. 1986; Lucientes et al. 1988; Martín-Sánchez et al. 1996). Both sand fly species exhibit anthrozoophilic behaviour (De Colmenares et al. 1995), determining their implication in endemic leishmaniasis outbreaks. Martín-Sánchez et al. (2009) reported a clear agreement between canine leishmaniasis incidence and *Ph. perniciosus* presence and similar findings were described in central Spain (Gálvez et al. 2010) and in northern Spain where *Ph. ariasi* predominated over *Ph. perniciosus* (Aransay et al. 2004). The finding of *L. infantum* positive *Phlebotomus* spp. in southern and southwestern locations of the study region confirms the higher risk of these areas with respect to northern cooler areas. However, current climatic trends in the Mediterranean basin associated to climatic change may increase the environmental favourability for both the vector and the pathogen (e.g. Maroli et al. 2008), for which preventive measures need to be considered for the whole region, specially because *Phlebotomus* spp. are already present in these regions although at low abundances. An additional risk comes from wildlife; the evidence of wild carnivores in the study region as potential reservoirs of *L. infantum* (Sobrino et al. 2008) together with their widespread distribution in the region and their high dispersal potential (Gortázar 1999) increases potential exchange of vectors and pathogen between geographically close regions.

In addition to *L. infantum*, public and animal health authorities need additionally to consider other pathogens transmitted by phlebotomine sand flies, such as TOSV –

currently endemic in some parts of Spain, Corfou virus from Greece (Rodhain et al. 1985), Massilia virus from France (Charrel et al. 2009) and Arbia virus from Italy (Depaquit et al. 2010). Dohm et al. (2000) reported the ability of *Phlebotomus* spp. to transmit Rift Valley Fever virus – currently one of the most threatening diseases for the European Union – under laboratory conditions, thus adding concern to the health risks posed by phlebotomine sand flies.

The high risk of introduction to Europe of vectors and pathogens causing potential diseases in animals and humans (Papa et al. 2006; Izri et al. 2008) indicates the need of including every region in a European-wide entomological surveillance network. Only basic information from environmentally different regions in Europe would be of quality enough for implementing vector-borne disease preventive and control measures.

### **Acknowledgements**

We have to give thanks to the “Agencia Estatal de Meteorología” (AEMET; Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) for providing climatic data employed in this study. We also wish to thank the regional government (Junta de Comunidades de Castilla – La Mancha - JCCM) for providing us with livestock data. This study is a contribution to project POII09-0141-8176 funded by JCCM and EU-FEDER. We also wish to thank Luccia Verdiccio for help with field and lab work. F. Ruiz-Fons was funded by a Juan de la Cierva contract (Ministerio de Economía y Competitividad). P. Acevedo was supported by a Beatriu de Pinós fellowship funded by Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament d’Innovació, Universitats i Empresa, of the Generalitat de Catalunya, and the COFUND Programme - Marie Curie Actions under 7th Marc Programme of the European Community. The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Acevedo P, Vicente J, Höfle U et al (2007) Estimation of European wild boar relative abundance and aggregation: a novel method in epidemiological risk assessment. *Epidemiology and Infection* 135:519–527
- Acevedo P, Ruiz-Fons F, Vicente J et al (2008) Estimating red deer abundance in a wide range of management situations in Mediterranean habitats. *Journal of Zoology* 276:37–47
- Acevedo P, et al. (2010) A broad assessment of factors determining *Culicoides imicola* abundance: modelling the present and forecasting its future in climate change scenarios. *Plos one* 5:e14236
- AEMET (2011) Agencia Estatal de Meteorología. Gobierno de España.  
<http://www.aemet.es>
- Alexander B, Maroli M (2003) Control of phlebotomine sandflies. *Medicine and Veterinary Entomology* 17(1):1-18
- Aransay AM, Testa JM, Morillas-Márquez F, Lucientes J, Ready PD (2004) Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. *Parasitology Research* 94(6):416-420
- Barón SD, Morillas-Márquez F, Morales-Yuste M, Diaz-Saez V, Irigaray C, Martín-Sánchez J (2011) Risk maps for the presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* in an endemic area of leishmaniasis in southern Spain: implications for the control of the disease. *Parasitology* 138(10):1234-1244
- Bongiorno G, Habluetzel A, Khoury C, Maroli M (2003) Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Tropica* 88 (2):109-116
- Castañeda R, et al. (1999) Estudio de seroprevalencia de la leishmaniosis canina en perros censados en Madrid. *Consulta de difusión veterinaria* 7: 836–841
- Charrel RN, et al. (2005) Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 11(11):1657-1663
- Charrel RN, et al. (2007) Cocirculation of 2 genotypes of Toscana virus, southeastern France. *Emerging Infectious Diseases* 13(3):465-468
- Charrel RN, et al. (2009) Massilia virus, a novel Phlebovirus (*Bunyaviridae*) isolated from sandflies in the Mediterranean. *Vector Borne Zoonotic Disease* 9 (5):519-30
- Colacicco-Mayhugh MG, Masuoka PM, Grieco, JP (2010) Ecological niche model of *Phlebotomus alexandri* and *P. papatasi* (Diptera: *Psychodidae*) in the Middle East. *International Journal of Health Geographics* 9:2
- Conesa-Gállego E, Romera Lozano E, Martínez Ortega E (1999) Study of the sandfly populations in the community of Madrid. *Anales de Biología (Murcia)* 22:43-50
- De Colmenares M, et al. (1995) Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: *Psychodidae*) in Spain by a competitive enzyme-linked-immunosorbent-assay biotin-avidin method. *Journal of Medical Entomology* 32(3):229-233
- De Ory F, Gegúndez MI, Fedele CG, Sánchez-Seco MP (2009) Toscanavirus, West Nile virus and lymphocoriomeningitis virus as causing agents of aseptic meningitis in Spain. *Medicina Clínica* 132:587–590
- Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE, Peyrefitte C (2010) Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Eurosurveillance* 15(10):40-47

- Dohm DJ, Rowton ED, Lawyer PG, O'Guinn M, Turell MJ (2000) Laboratory transmission of Rift Valley fever virus by *Phlebotomus duboscqi*, *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus sergenti*, and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: *Psychodidae*). *Journal of Medical Entomology* 37(3):435-438
- El-Badry A, Al-Juhani A, Ibrahim E-K, Al-Zubiany S (2008) Distribution of sand flies in El-Nekheil province, in Al-Madinah Al-Munawwarah region, western of Saudi Arabia. *Parasitology Research* 103(1):151-156
- Elnaiem DA, et al. (1998) Environmental determinants of the distribution of *Phlebotomus orientalis* in Sudan. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 92(8):877-887
- Faiman R, Cuno R, Warburg A (2009) Comparative efficacy of three suction traps for collecting phlebotomine sand flies (Diptera: *Psychodidae*) in open habitats. *Journal of Vector Ecology* 34(1):114-118
- Gállego-Berenguer J, Botet-Fregola J, Gállego-Culleré M, Portús-Vinyeta M (1992) Los flebótomos de la España peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura. In: Hernández S (ed) *In Memoriam al Prof Dr D F de P Martínez Gómez*. Publicaciones de la Universidad de Córdoba, Córdoba 581–600
- Gage KL, Burkot TR, Eisen RJ, Hayes EB (2008) Climate and vector borne diseases. *American Journal of Preventive Medicine* 35(5):436-450
- Gálvez R, et al. (2010) Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Tropica* 115(1-2): 95-102
- Gil-Collado J, Morillas F, Sanchís MC (1989) Los flebótomos en España. *Revista de Sanidad e Higiene Pública* 63:15-34
- Giménez B (1999) Madrid, Castilla – La Mancha. National Geographic Society, Barcelona
- Gortázar C (1999) Ecología y patología del zorro (*Vulpes vulpes*) en el Valle del Ebro. Universidad de Zaragoza
- Gramiccia M, Gradoni L (2007) The Leishmaniasis of Southern Europe. In: Takken W and Knols BGH (eds). *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe*. Academic Publishers, Wageningen 75-95
- Hotez PJ, Savioli L, Fenwick A (2012) Neglected tropical diseases of the Middle East and North Africa: review of their prevalence, distribution and opportunities for control. *Plos Neglected Tropical Diseases* 6:475
- Hilmy NM, Shehata MG, el Housary S, Kamal H, Doha S, El Said S (1989) Investigation of sampling methods for the study of Phlebotomine sandflies in Egypt. *The Journal of the Egyptian Public Health Association* 64 (5-6):401-15
- Izri A, Temmam S, Moureau G, Hamrioui B, de Lamballerie X, Charrel RN (2008) Sandfly fever Sicilian virus, Algeria. *Emerging Infectious Diseases* 14(5):795-797
- Jenks G (1967) The data model concept in statistical mapping. *International Yearbook of Cartography* 7:186–190
- Kaul SM, Sharma RS, Borgohain BK, Das NS, Verghese T (1994) Absence of *Phlebotomus argentipes* Ann and Brun. (Diptera: *Psychodidae*) the vector of Indian kala-azar from Kamrup District, Assam. *Journal of Communicable Diseases* 26(2):68-74
- Killick-Kendrick R (1987) Breeding places of *Phlebotomus ariasi* in the Cevennes. Focus of leishmaniasis in the south of France. *Parassitologia* 29(2-3):181-191
- Killick-Kendrick R (1999) The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology* 17(3):279-289

- Lachaud L, et al. (2002) Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology* 125: 197–207
- Lucientes J, Sánchez-Alcedo C, Castillo-Hernández JA, Estrada-Peña A (1988) Sobre la infección natural por *Leishmania* en *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, y *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, en el foco de leishmaniosis de Zaragoza. *Revista Ibérica de Parasitología* 48(1):7-8
- Léger N, Pesson B, Madulo-Leblond G, Abonnenc E (1983) Sur la différenciation des femelles du sous-genre *Larroussius* Nitzulesc, 1931 (Diptera: *Phlebotomidae*) de la région méditerranéenne. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 58:611–623
- Maroli M, Bigliocchi F, Khoury C (1994) I Flebotomi in Italia: osservazioni sulla distribuzione e sui metodi di campionamento. *Parassitologia* 36(3):251-264
- Maroli M, Rossi L, Baldelli R et al (2008) The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine and International Health* 13:256-264
- Martín-Sánchez J, Guilvard E, Acedo-Sánchez C, Wolfecheverri M, Sanchiz-Marin MC, Morillas-Márquez F (1994) *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, Infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the Granada province (Southern Spain). *International Journal for Parasitology* 24(3):405-408
- Martín-Sánchez J, et al. (1996) *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 from southern Spain: characterisation of the strains from human visceral and cutaneous leishmaniasis and from sandflies: with a numerical analysis of the isoenzymatic data. *Systematic Parasitology* 33:177–182
- Martín-Sánchez J, Morales-Yuste M, Acedo-Sánchez C, Barón S, Diaz V, Morillas-Márquez F (2009) Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerging Infectious Diseases* 15(5):795-8
- Martínez Ortega E, Conesa Gállego E (1987) Fenología de los flebotomos del subgénero *Larroussius* (*Dip. Psychodidae*, *Phlebotomus*) en el sureste de la Península Ibérica. *Boletín de la Asociación Española de Entomología* 11: 293-300
- Munstermann LE (2004) Phlebotomine Sand Flies, the Psychodidae. In: Marquardt WC (ed) *Biology of Disease Vectors*. 2 edn. Elsevier, Oxford
- Papa A, Konstantinou G, Pavlidou V, Antoniadis A (2006) Sandfly fever virus outbreak in Cyprus. *Clinical Microbiology and Infection* 12:192-4
- Promed (2012) Program for Monitoring Emerging Diseases  
[www.promedmail.org/es](http://www.promedmail.org/es)
- Randolph SE (2009) Tick-borne disease systems emerge from the shadows: the beauty lies in molecular detail, the message in epidemiology. *Parasitology* 136:1403–1413
- Ready PD (2010) Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance* 15:19505
- Real R, et al. (2003) Relative importance of environment, human activity and spatial situation in determining the distribution of terrestrial mammal diversity in Argentina. *Journal of Biogeography* 30:939–947
- Rioux JA, Golvan YJ, Croset H, Houin R (1969) Lesleishmanioses dans le 'Midi' mediterraneen. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 62:332-333
- Rioux JA, et al. (1986) Isolation of *Leishmania major* Yakimoff and Schokhor, 1914 (Kinetoplastida-Trypanosomatidae) in *Meriones shawi-shawi* (Duvernoy, 1842) (Rodentia-Gerbillidae) of Tunisia. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 61(2):139-145



- Rodhain F, Maduloleblond G, Hannoun C, Tesh RB (1985) Corfou virus - a new phlebovirus isolated from phlebotomine sandflies in Greece. *Annales De L Institut Pasteur-Virology* 136 (2):161-166
- Ruiz-Fons F, Vidal D, Vicente J et al (2008) Epidemiological risk factors of Aujeszky's disease in wild boars (*Sus scrofa*) and domestic pigs in Spain. *European Journal of Wildlife Research* 4:549–555
- Ruiz-Fons F, Fernández-de-Mera IG, Acevedo P, Gortázar G, de la Fuente J (2012) Factors driving the abundance of *Ixodes ricinus* ticks and the prevalence of zoonotic *I. ricinus*-borne pathogens in natural foci. *Applied and Environmental Microbiology* 78:2669–2676
- Shin EH, Lee WJ, Lee HI, Lee DK, Klein TA (2005) Seasonal population density and daily survival of anopheline mosquitoes (Diptera: *Culicidae*) in a malaria endemic area, Republic of Korea. *Journal of Vector Ecology* 30(1):33-40
- Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga A et al (2008) Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology* 155:198-203
- Valcárcel Y, Bastero R, Anegón M, González S, Gil A (2008) Epidemiología de los ingresos hospitalarios por leishmaniasis en España (1999-2003). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 26:278-281



# Discusión general

---





## **Discusión General**

Partiendo de la gran influencia que los condicionantes ambientales tienen sobre la dinámica poblacional de los vectores artrópodos como culícidos, jejenes y flebótomos, entre otros, averiguar el papel que juegan esos factores ambientales es esencial en el estudio de la dinámica y en el control de los patógenos que transmiten. En la actualidad esta información básica continúa siendo escasa en la mayoría de países y regiones del mundo (Braks et al. 2011). Este hecho pone de manifiesto la necesidad real de mejorar el conocimiento acerca de la dinámica poblacional de los vectores – distribución, abundancia, composición y condicionantes ambientales – a diferentes escalas geográficas, particularmente a escalas locales y regionales. La información obtenida en este trabajo de Tesis Doctoral proporciona una parte de esa información básica en Castilla – La Mancha, un territorio geográfico extenso dentro de la península ibérica. Esta Tesis constituye así una primera base para la estimación de riesgos potenciales de aparición de enfermedades transmitidas por vectores en un momento de la historia reciente en el que éstas tienen una gran relevancia sanitaria.

### *Consideraciones metodológicas*

En este trabajo de Tesis Doctoral se estudia principalmente la presencia y distribución geográfica de vectores del orden Diptera en una región del centro-sur de España dominada por el clima mediterráneo. Braks et al. (2011) señalaron que la información generada a partir de los estudios de presencia de vectores es una herramienta esencial para la generación de mapas de riesgo de utilidad en salud pública. Por lo tanto, el método de captura elegido para el estudio de especies de interés es esencial para obtener una información representativa y fiable. Actualmente existen múltiples herramientas para la captura de dípteros vectores, aunque no hay una herramienta universal que de

forma genérica funcione para todos los grupos de dípteros que pueden ser vectores de enfermedades. En los trabajos realizados en esta Tesis Doctoral se eligieron las trampas tipo CDC creadas por Sudia y Chamberlain (1962) en base a que estudios previos señalan que con este modelo de trampas se captura mayor cantidad y diversidad de culícidos que con otras trampas (Ritchie y Daniel 1995). Como el objetivo principal de este trabajo no era determinar sólo las especies de culícidos sino también de otros grupos de dípteros, se comprobó en la literatura científica cuál era la eficacia de estas trampas para capturar tanto *Culicoides* como flebótomos (Rowley y Jorgensen 1967; Wieser-Schimpf et al. 1990; Alexander 2000; Venter y Hermanides 2006; Cohnstaedt et al. 2008). Además, Eldridge (2005) señaló que para la estimación de la abundancia de estados adultos de estos vectores es recomendable el uso de trampas CDC; por lo general con un atrayente: luz, CO<sub>2</sub> o ambos. Por cuestiones logísticas el atrayente empleado en este trabajo consistió en dos tipos de luz – blanca y ultravioleta, utilizando exactamente el mismo sistema para todos los puntos de muestreo y por ello proporcionando una información comparable entre localidades.

Cabe también mencionar que la realización de tres muestreos en un ciclo anual puede haber tenido un efecto en las estimas de abundancia ya que las series temporales son recomendables en estudios de dinámica poblacional. Sin embargo, los muestreos se planificaron dentro de la época de actividad descrita en la península ibérica para cada uno de los vectores (ver capítulos correspondientes), incluyendo las épocas de mayor abundancia esperada. De forma añadida, el muestreo se realizó por igual en todos y cada uno de los puntos de muestreo, por lo que el muestreo estuvo bien balanceado entre localidades. Por ello, este estudio proporciona una información totalmente comparable entre puntos de estudio y por lo tanto se considera que las relaciones ambiente-vector observadas son fiables.

*Abundancia, diversidad y distribución de dípteros en Castilla – La Mancha y riesgos sanitarios asociados*

*Culícidos*

Como se describe en el primer capítulo de este trabajo de Tesis Doctoral, *Culex pipiens* es la especie de culícido más abundante y con mayor distribución en Castilla – La Mancha. Este hallazgo puede contribuir a la política de prevención de riesgos de enfermedades transmitidas por mosquitos en la región ya que circunscribe en gran medida los riesgos potenciales a aquellas enfermedades en las que *Cx. pipiens* sea vector. Muestra paralelamente la necesidad de centrar esfuerzos de investigación en estos patógenos, ya sean endémicos o exóticos. Este primer hallazgo señala también la importancia de profundizar en la dinámica de las poblaciones de esta especie de mosquito en la región como medida de mejora de los sistemas de prevención sanitarios, aspecto que se abordó en el capítulo 2 y que se discute más adelante.

Son numerosos los patógenos en los que *Cx. pipiens* actúa como vector primordial o secundario, entre los que cabe mencionar el virus de West Nile (WN), el virus Chikungunya, el virus Usutu, el virus Sindbis, el virus Tahyna, el virus de la fiebre del valle del Rift, el virus de la encefalitis japonesa, *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, o *Dirofilaria immitis*. Estos son agentes patógenos transmitidos por mosquitos que deberían estar recogidos dentro de la lista de prioridades de las autoridades sanitarias regionales y nacionales. Dentro de estos patógenos, el más importante en la actualidad en España – y quizás en la mayor parte de Europa es el virus de WN, ya que es responsable de numerosos brotes de enfermedad en personas y animales en países de la cuenca mediterránea. En España también se ha implicado al virus de WN en numerosos brotes de meningoencefalitis humana y equina (García-Bocanegra et al. 2011) e incluso en especies de aves en peligro (Höfle et al. 2008). Este trabajo de Tesis Doctoral señala

el riesgo de presencia del virus de WN es elevado en Castilla – La Mancha debido a la presencia de *Cx. pipiens* en prácticamente toda la región, si bien es necesario estimar la influencia de factores ambientales sobre la ecología de este patógeno. La mayor abundancia de *Cx. pipiens* en ambientes acuáticos moderadamente templados y donde las actividades humanas son elevadas dentro de la región, da pistas de hacia dónde se deben dirigir futuros esfuerzos de monitorización y las áreas donde las autoridades sanitarias deben poner su punto de mira. Además del virus de WN, la reciente aparición del virus Usutu en algunas regiones de la península ibérica (Vázquez et al. 2011) junto con la abundancia y distribución de *Cx. pipiens* – uno de sus vectores principales – pone de manifiesto la potencial exposición de las poblaciones de aves de Castilla – La Mancha a este patógeno. El virus Usutu causó recientemente brotes con elevada mortalidad en mirlos (*Turdus merula*) en Austria (Weissenböck et al. 2010), constituyendo una amenaza potencial para la conservación de aves protegidas en Castilla – La Mancha. Sin embargo, a día de hoy se desconoce si este agente está presente en la región. La presencia de poblaciones estables de *Cx. pipiens* y la gran diversidad y abundancia de aves acuáticas – tanto autóctonas como migratorias - en los humedales manchegos (Pérez-Ramírez et al. 2010) ofrecen una gran oportunidad de expansión tanto para el virus de WN como para el virus Usutu. La Unión Europea tiene actualmente puesta su atención en un importante patógeno zoonótico cuya aparición podría ser desastrosa tanto para el sector agropecuario como para los sistemas de salud pública europeos, el virus de la fiebre del Valle del Rift. Múltiples brotes causados por este virus han tenido lugar fuera del continente africano donde es endémico (Balkhy y Memish 2003; Chevalier et al. 2010), mostrando su elevada capacidad “migratoria”. Boshra et al. (2011) señalan que el aumento de las transacciones comerciales tanto dentro como fuera del continente africano junto con las alteraciones ocasionadas por el



cambio climático en las poblaciones de mosquitos de la cuenca Mediterránea constituye un elevado riesgo de introducción a la Unión Europea. Turell (1989) señala a *Cx. pipiens* como el vector más importante del virus de la fiebre del valle del Rift en la cuenca Mediterránea. Además, otros grupos de vectores como *Culicoides imicola* y *C. obsoletus*, e incluso algunas especies de flebótomos, podrían ser vectores del virus (Glick 1990; Turell y Perkins 1990; Chevalier et al. 2010), añadiendo complejidad a la epidemiología de este virus en tierras europeas, especialmente en la cuenca mediterránea.

La malaria está considerada en la actualidad como una de las enfermedades emergentes más importantes del planeta (Becker et al. 2010), mostrando el potencial de expansión hacia zonas libres. Un hallazgo destacable de esta Tesis Doctoral con respecto a esta enfermedad es la baja abundancia de especies del género *Anopheles* en ambientes acuáticos continentales del interior de la península ibérica, lo que junto con la diversidad de factores que deben concurrir para el establecimiento de un ciclo endémico de malaria en un territorio (Bueno-Marí y Jiménez-Peydró 2008), señalan que el riesgo de establecimiento de ciclos endémicos de *P. vivax* – el agente causal de la malaria humana en Europa – es bajo. Además, el riesgo de malaria estaría “amortiguado” por el nivel social, económico y sobre todo sanitario establecido en la península ibérica. A pesar de todo, se han capturado cinco especies del género *Anopheles* que directa o indirectamente están relacionadas con la transmisión de *P. vivax* (Bueno-Marí y Jiménez-Peydró 2008; Reusken 2011), por lo que el riesgo, aunque bajo, no es despreciable.

*Culicoides*

Algunos de los problemas sanitarios que mayor impacto han tenido en el sector pecuario europeo en las últimas décadas han estado vinculados a enfermedades transmitidas por jejenes del género *Culicoides*. Dentro de ellos debemos mencionar los casos del virus de la peste equina africana (Sánchez-Vizcaíno 2004), el virus de la lengua azul (Sperlova y Zendulkova 2011) o el más reciente del virus Schmallenberg (Hoffmann et al. 2012). Estos ejemplos ponen en evidencia la gran necesidad de profundizar en un factor común a estas enfermedades, la dinámica poblacional de sus vectores. A la Unión Europea el control de este virus le ha supuesto grandes esfuerzos humanos y económicos en acciones como la vacunación, la demarcación territorial para la comercialización de animales y sus productos, la creación de programas de vigilancia entomológica y la vigilancia epidemiológica (Van Rijn et al. 2012). Estos esfuerzos, sin embargo, no han repercutido en la erradicación total del virus de la lengua azul del ganado, y en la actualidad la enfermedad es endémica en numerosos países (Rasve 2011).

Antes de la realización de este trabajo de Tesis Doctoral el conocimiento sobre las poblaciones de jejenes del género *Culicoides* en ambientes no ganaderos era escaso, sólo limitado a algún punto de muestreo extraordinario dentro de los programas de vigilancia entomológica establecidos en numerosos países de Europa tras la emergencia de estas enfermedades. En este trabajo de Tesis Doctoral se muestra que las dos especies principales de jejenes involucradas en la transmisión de los virus de la peste equina africana (PEA) y de la lengua azul (LA) – *Culicoides imicola* y *C. obsoletus* - no son abundantes en ambientes no ganaderos en una región en la que ambas son periódicamente capturadas en granjas de rumiantes (Calvete et al. 2008; Acevedo et al. 2010). Los resultados de esta Tesis Doctoral sugieren, por lo tanto, que debemos de ejercer un cambio en la percepción de la epidemiología del virus de la LA y de sus

vectores, especialmente debido a la probable existencia de un ciclo silvestre del virus (Bocanegra et al. 2011; Falconi et al. 2012) y a la presencia y amplia distribución en Castilla – La Mancha de vectores potenciales – como es el caso de las especies del grupo *C. pulicaris* (Caraccapa et al. 2003) en ambientes no ganaderos. Sería necesario profundizar en la relación entre el virus de la LA, los jejenes del grupo *C. pulicaris* y los ungulados silvestres, especialmente cuando las poblaciones de estos últimos presentan tendencias crecientes (Acevedo et al. 2007, 2008).

Aplicar los resultados entomológicos obtenidos en esta Tesis a la valoración de riesgos de transmisión de otros patógenos vinculados a *Culicoides* spp., como el virus de la PEA y el virus Schmallerberg, es difícil. En el caso de la PEA porque hasta la fecha ninguna especie silvestre en Europa parece estar vinculada al ciclo de vida de este patógeno, especialmente debido a la ausencia de équidos silvestres. En el segundo caso, porque a día de hoy la vinculación de los jejenes del género *Culicoides* en el ciclo de vida del virus Schmallerberg no ha sido demostrada (Lievaart-Peterson et al. 2012). Sin embargo, cabe señalar que la fauna silvestre europea puede tener un papel importante sobre la dinámica de los vectores de ambos patógenos, implicándose indirectamente en la epidemiología de ambos. Este aspecto ha sido bien estudiado en la epidemiología de algunos patógenos transmitidos por garrapatas, donde especies de animales silvestres no reservorios modulan la prevalencia del patógeno a través de su vínculo con el vector (Sood et al. 2011; Ruiz-Fons et al. 2012). Un aspecto que también debe ser considerado para evaluar la potencial expansión del virus de la PEA en Europa es el hecho de que algunas especies de culícidos– *Cx. pipiens*, por ejemplo– han sido descritas como vectores (Braverman y Boorman 1978; Wilson et al. 2009). Los resultados de los dos primeros capítulos de esta Tesis Doctoral aportan, por lo tanto, información sobre potenciales vectores de este virus que deben ser considerados en los análisis de riesgo

de exposición a esta importante enfermedad. De forma global, esta complejidad demuestra que la dinámica hospedador-vector y hospedador-vector-patógeno en ecosistemas complejos como los existentes en Castilla – La Mancha debe ser objeto de una profunda investigación futura.

Otra enfermedad de gran relevancia para la Unión Europea por su riesgo de introducción y por la presencia de vectores competentes es la enfermedad epizootica hemorrágica (EEH). LA EEH es ocasionada por el virus de su mismo nombre, un *Orbivirus* con gran homología con el virus de la lengua azul y que afecta principalmente a rumiantes, tanto domésticos como silvestres (Eschbaumer et al. 2012). Hasta ahora no se han descrito casos en la Unión Europea, pero los recientes brotes registrados en países vecinos y el hecho de que *C. imicola* y miembros de los complejos *C. pulicaris* y *C. obsoletus* sean vectores competentes ha activado los sistemas de alerta sanitaria en la Unión Europea (EFSA 2009). Eschbaumer et al (2012) señalan que la introducción del virus de la enfermedad hemorrágica epizootica a Europa se podría dar tanto a partir de la importación de animales infectados como por la llegada de vectores portadores del virus impulsados por el viento (Sellers et al. 1991). El papel de la fauna silvestre europea, principalmente de los rumiantes silvestres, en un posible ciclo silvestre del virus de la enfermedad epizootica hemorrágica no es conocido. Rumiantes silvestres europeos como el ciervo rojo (*Cervus elaphus*), el gamo (*Dama dama*) y el corzo (*Capreolus capreolus*) son capaces de infectarse experimentalmente (Gibbs y Lawman 1977). La introducción de los serotipos 1 y 2 del virus a Norteamérica ha demostrado que un ciclo silvestre de la enfermedad es posible. Rumiantes silvestres como el venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), el bisonte americano (*Bison bison*) o el wapití (*Cervus elaphus canadensis*) pueden sufrir EHE (MacLachlan et al. 2010; Nol et al. 2010). El ejemplo americano junto con lo que hoy en día conocemos acerca del papel de

la fauna silvestre en el virus de la LA (Ruiz-Fons et al. 2008; García et al. 2009; López-Olvera et al. 2010; Rodríguez-Sánchez et al. 2010; García-Bocanegra et al. 2011; Falconi et al. 2012) y junto con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, señalan que el potencial del virus de la EHE en la fauna silvestre española es muy elevado. Las consecuencias para la industria cinegética y para la conservación podrían ser catastróficas, por lo que este ejemplo, si cabe, refleja aún más la necesidad de profundizar en el conocimiento de las relaciones entre jejenos vectores y hospedadores silvestres que pueden ser reservorios o víctimas de este agente patógeno.

### *Flebótomos*

Las principales especies de flebótomos que actúan como vectores de enfermedades relevantes en salud pública y sanidad animal en la cuenca del Mediterráneo son *Phlebotomus perniciosus* y *Ph. ariasi*. Estas son dos especies que actualmente parecen estar en expansión hacia el norte en el continente europeo (Kuhn 1999). Ambas especies son vectores primordiales de agentes patógenos tan importantes como *Leishmania infantum* y virus del género *Phlebovirus* en la cuenca mediterránea occidental (Rioux et al. 1986; Martín-Sánchez et al. 1994; Charrel et al. 2007). Ambas especies fueron encontradas en el estudio realizado en este trabajo de Tesis Doctoral. Otras especies más abundantes como *Sergentomyia minuta* no fueron capturadas en este trabajo debido a la aproximación metodológica, pero estas especies actualmente no se consideran como vectores relevantes de patógenos para animales y personas.

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral muestra las zonas de mayor riesgo potencial de enfermedades vehiculadas por *Ph. perniciosus* y *Ph. ariasi* en Castilla – La Mancha. La mayor abundancia esperable de *Ph. perniciosus* en ambientes agrícolas de zonas cálidas dentro de la región muestra las zonas de mayor riesgo potencial de

exposición a patógenos transmitidos por esta especie de flebótomo– como *L. infantum* y flevovirus endémicos como el virus Toscana (Sanbonmatsu 2005)– en ambientes no urbanos de la región. En relación a *L. infantum* – el agente causal de la leishmaniasis humana y canina en Europa –, cabe señalar que es un patógeno endémico en casi toda la cuenca del Mediterráneo (Gramiccia y Gradoni 2005). La leishmaniasis en España ha sufrido un incremento tanto en prevalencia como en distribución en las últimas décadas (Molina et al 2012). Los recientes brotes masivos de leishmaniasis en la Comunidad Autónoma de Madrid lo ponen en evidencia. Cabe mencionar que Castilla – La Mancha presenta el segundo mayor porcentaje de hospitalizaciones por leishmaniasis, una evidencia de la importante repercusión en salud pública que tiene *L. infantum* en la región (Valcárcel et al. 2008). Esto, unido a la evidencia de que los carnívoros silvestres en esta región pueden actuar como reservorios (Sobrino et al. 2008) y al hecho de encontrar flebótomos positivos a ADN de *L. infantum* en el estudio realizado en esta Tesis, pone en evidencia la necesidad de profundizar en el conocimiento de las relaciones entre flebótomos, los patógenos que transmiten y los hospedadores silvestres. De forma añadida, el papel que los ungulados silvestres podrían tener en la dinámica poblacional de los flebótomos debe ser analizado con mayor profundidad, ya que la ausencia de vinculación encontrada en esta Tesis Doctoral puede únicamente ser debida a que el enfoque principal del muestreo no fue determinar el papel de estos hospedadores sobre los flebótomos. Un aspecto que todavía permanece inexplorado en Castilla – La Mancha – y en gran parte de la península ibérica – es la situación de los diferentes flebovirus que especies autóctonas de flebótomos pueden transmitir.

*Riesgos futuros de enfermedades transmitidas por vectores en Europa y España*

Son numerosos los factores que condicionan el riesgo de exposición de personas y animales a enfermedades transmitidas por vectores, tanto ambientales como sociales y económicos (Vora 2008). Estos factores pueden jugar un papel tanto en el caso de enfermedades endémicas como en el caso de enfermedades exóticas. En relación a las enfermedades exóticas – aquellas que mayor riesgo de emergencia pueden presentar por introducirse en un territorio totalmente nuevo – el riesgo de introducción y expansión depende de una serie de factores como la proximidad de un territorio libre a regiones endémicas, el intercambio comercial de animales y sus productos entre territorios endémicos y libres, la probabilidad de introducción a través de movimientos migratorios de hospedadores o de vectores y la presencia o el establecimiento de vectores competentes en el territorio libre. En este trabajo de Tesis Doctoral se ha pretendido aproximar los riesgos actuales y futuros para una amplia región en la península ibérica desde el punto de vista entomológico, tratando de prever las zonas de mayor riesgo tanto para patógenos endémicos como para patógenos exóticos.

La región de estudio presenta un gran potencial de emergencia de enfermedades exóticas transmitidas por vectores al encontrarse englobada en la península ibérica. Las razones de este riesgo derivan de varios factores, entre otros la proximidad al continente africano donde numerosas enfermedades importantes son endémicas, la gran cantidad de aves migratorias que atraviesan cada año la península ibérica desde sus zonas invernantes en el continente africano – portando con ellas patógenos y eventualmente vectores de enfermedades exóticas, – el elevado intercambio comercial establecido con países donde algunas enfermedades vectoriales relevantes son endémicas o las alteraciones que los cambios en la dinámica de hospedadores y del clima pueden ocasionar en las poblaciones de vectores (Pickering et al. 2012). Es esperable que la

globalización, el cambio climático y la migración masiva de personas se acentúen en los próximos años (Weiss y McMichael 2004), y con ello se produzcan cambios significativos en la distribución de las enfermedades transmitidas por vectores de forma global. El estudio y seguimiento de las poblaciones de artrópodos vectores es por tanto imprescindible para poder entender su rol epidemiológico y poder predecir y controlar los posibles efectos adversos de este riesgo potencial. El conocimiento de los vectores tendrá que desarrollarse de manera cada vez más detallada a nivel local y regional para así poder evaluar su situación global. Este trabajo de Tesis Doctoral pretende ser una primera aproximación para el establecimiento de sistemas de vigilancia y monitorización entomológica en Castilla-La Mancha que nos ayuden a afrontar esos riesgos con rigurosidad científica y a reducir el impacto y los costes de estas nuevas enfermedades, así como a controlar los efectos de las enfermedades que ya están presentes.

Es imprescindible resaltar la necesidad de interacción entre múltiples disciplinas dentro de las áreas de salud pública y sanidad animal, así como con las autoridades responsables del medio ambiente, con la finalidad de establecer un sistema eficaz de vigilancia entomológica que suponga a su vez la generación de un sistema de alerta epidemiológica temprana.

## **Bibliografía**

- Acevedo P, Vicente J, Höfle U, Cassinello J, Ruiz-Fons F, Gortázar C (2007) Estimation of European wild boar relative abundance and aggregation: a novel method in epidemiological risk assessment. *Epidemiology and Infection* 135(3):519-527
- Acevedo P, Ruiz-Fons F, Vicente J, Reyes-García AR, Alzaga V, Gortázar C (2008) Estimating red deer abundance in a wide range of management situations in Mediterranean habitats. *Journal of Zoology* 276(1):37-47
- Acevedo P, et al. (2010) A Broad Assessment of Factors Determining *Culicoides imicola* Abundance: Modelling the Present and Forecasting Its Future in Climate Change Scenarios. *Plos One* 5(12)



- Alexander B (2000) Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology* 14(2):109-122
- Balkhy HH, Memish ZA (2003) Rift Valley fever: an uninvited zoonosis in the Arabian peninsula. *International Journal of Antimicrobial Agents* 21(2):153-157
- Becker N, et al. (2010) Mosquitoes and their control, 2 nd edn. Springer, Heidelberg
- Boshra H, Lorenzo G, Busquets N, Brun A (2011) Rift Valley Fever: Recent Insights into Pathogenesis and Prevention. *Journal of Virology* 85(13):6098-6105
- Braks M, et al. (2011) Towards an integrated approach in surveillance of vector-borne diseases in Europe. *Parasites and Vectors* 4:192
- Braverman Y, Boorman J (1978) Rates of infection in, and transmission of, African horse sickness virus by *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Virologica* 22(4):329-332
- Bueno-Marí R, Jiménez P (2008) Malaria en España: aspectos entomológicos y perspectivas de futuro. *Revista Española de Salud Pública* 82:467-489
- Busquets N, et al. (2010) Experimental Infection of young Adult European Breed Sheep with Rift Valley Fever Virus Field Isolates. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 10(7):689-696
- Calvete C, Estrada R, Miranda MA, Borrás D, Calvo JH, Lucientes J (2008) Modelling the distributions and spatial coincidence of bluetongue vectors *Culicoides imicola* and the *Culicoides obsoletus* group throughout the Iberian peninsula. *Medical and Veterinary Entomology* 22(2):124-134
- Caracappa S, et al. (2003) Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Veterinary Record* 153(3):71-74
- Charrel RN, et al. (2007) Cocirculation of 2 genotypes of Toscana virus, southeastern France. *Emerging Infectious Diseases* 13(3):465-468
- Chevalier V, Pepin M, Plee L, Lancelot R (2010) Rift Valley fever - a threat for Europe? *Eurosurveillance* 15(10):18-28
- Cohnstaedt LW, Gillen JI, Munstermann LE (2008) Light-emitting diode technology improves insect trapping. *Journal of the American Mosquito Control Association* 24(2):331-334
- EFSA (2009) Epizootic Hemorrhagic Disease. In: EFSA (ed) *Journal* 7: 1418-1425
- Eldridge BF (2005) Mosquitoes, the Culicidae. In: Marquardt WC (ed) *Biology of Disease Vectors*. Elsevier Science and Technology, London 95-110
- Eschbaumer M, et al. (2012) Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 7 in European cattle and sheep: Diagnostic considerations and effect of previous BTV exposure *Veterinary Microbiology In press*
- Falconi C, et al. (2012) Evidence for BTV-4 circulation in free-ranging red deer (*Cervus elaphus*) in Cabañeros National Park, Spain. *Veterinary Microbiology In press*
- García I, et al. (2009) Bluetongue epidemiology in wild ruminants from Southern Spain. *European Journal of Wildlife Research* 55 (2): 173-178
- García-Bocanegra I, et al. (2011) Serosurvey of West Nile Virus and Other Flaviviruses of the Japanese Encephalitis Antigenic Complex in Birds from Andalusia, Southern Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11(8):1107-1113
- Gibbs EP, Lawman MJ (1977) Infection of British deer and farm animals with epizootic haemorrhagic disease of deer virus. *Journal of Comparative Pathology* 87: 335-343
- Gramiccia M, Gradoni L (2005) The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology* 35(11):1169-1180

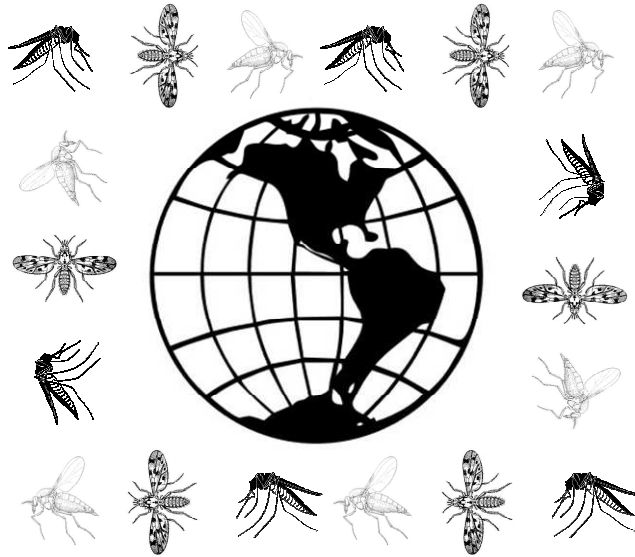
- Hoffmann B, et al. (2012) Novel Orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerging Infectious Diseases* 18(3):469-472
- Höefle U, et al. (2008) West Nile virus in the endangered Spanish imperial eagle. *Veterinary Microbiology* 129(1-2):171-178
- Kuhn GK (1999) Global warming and leishmaniasis in Italy. *Bulletin Tropical Medicine International Health* 7:1-2
- Lievaart-Peterson K, Luttikholt SJM, Van den Brom R, Vellema P (2012) Schmallenberg virus infection in small ruminants First review of the situation and prospects in Northern Europe. *Small Ruminant Research In press*
- López-Olvera JR, et al. (2010) Experimental infection of European red deer (*Cervus elaphus*) with bluetongue virus serotypes 1 and 8 *Veterinary Microbiology* 145:148-152
- MacLachlan NJ, Guthrie AJ (2010) Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other Orbivirus diseases. *Veterinary Research* 41(6)
- Martín-Sánchez J, Guilvard E, Acedo-Sánchez C, Wolf-Echeverry M, Sanchiz-Marín MC, Morillas-Márquez F (1994) *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the Granada province (southern Spain) *International Journal Parasitology* 24: 405-408
- Molina R, et al. (2012) The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary Parasitology In press*
- Nol P, et al. (2010) Epizootic hemorrhagic disease outbreak in a captive facility housing white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), bison (*Bison bison*), elk (*Cervus elaphus*), cattle (*Bos taurus*), and goats (*Capra hircus*) in Colorado. *Journal of Zoo Wildlife Medicine* 41: 510-515
- Pérez Ramírez E, Gerrikagoitia X, Barral M, Höefle U (2010) Detection of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds in Castilla-La Mancha (south central Spain). *Veterinary Microbiology* 146:200-208
- Pickering J, Fawcett L, Munstermann L (2012) An alternative approach: teaching evolution in a natural history museum through the topic of vector-borne disease. *Evolution. Education and Outreach*:1-6
- Promed (2012) Program for Monitoring Emerging Diseases. <http://www.promedmail.org>
- Purse BV, Brown HE, Harrup L, Mertens PPC, Rogers DJ (2008) Invasion of bluetongue and other orbivirus infections into Europe: the role of biological and climatic processes. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties* 27(2):427-442
- Rasve (2011) Red de Alerta Sanitaria Veterinaria. Gobierno de España. <http://www.rasve.mapa.es>
- Rioux JA (1986) *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques, Colloque international du CNRS/INSERM, 1984, IMEEE, Montpellier 498-502
- Ritchie SA, Kline DL (1995) Comparison of CDC and EVS Light Traps Baited with Carbon Dioxide and Octenol for Trapping Mosquitoes in Brisbane, Queensland (Diptera: *Culicidae*). *Journal of the Australian Entomological Society* 34:215-218
- Rodriguez-Sanchez B, Gortázar C, Ruiz-Fons F, Sanchez-Vizcaino JM (2010) Bluetongue Virus Serotypes 1 and 4 in Red Deer, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 16(3):518-520

- Rowley WA, Jorgense N (1967) Relative effectiveness of three types of light traps in collecting adult *Culicoides*. *Journal of Economic Entomology* 60(5):1478-1490
- Ruiz-Fons F, Reyes-Garcia AR, Alcaide V, Gortazar C (2008) Spatial and temporal evolution of bluetongue virus in wild ruminants, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 14(6):951-953
- Sanbonmatsu-Gamez S, et al. (2005) Toscana virus in Spain. *Emerging Infectious Diseases* 11(11):1701-1707
- Sanchez-Vizcaino JM (2004) Control and eradication of African horse sickness with vaccine. In: Schudel ALM (ed) *Control of Infectious Animal Diseases by Vaccination. Developments in Biologicals* 119: 255-258
- Sellers R F, Maarouf A R (1991) Possible introduction of epizootic hemorrhagic disease of deer virus (serotype 2) and bluetongue virus (serotype 11) into British Columbia in 1987 and 1988 by infected *Culicoides* carried on the wind. *Canadian Journal Veterinary Research* 55(4): 367-370
- Sperlova A, Zendulkova D (2011) Bluetongue: a review. *Veterinarni Medicina* 56 (9): 430-452
- Sobrinho R, et al. (2008) Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology* 155(3-4):198-203
- Sood S, O'Connell K, Weber K (2011) The emergence and epidemiology of Lyme borreliosis in Europe and North America, in *Lyme borreliosis in Europe and North America: Epidemiology and Clinical Practice* (ed Sood S), John Wiley and Sons, Inc, Hoboken, NJ
- Sudia WD, Chamberlain RW (1962) Battery-operated light trap, an improved model. *Mosquito News* 22:126-129
- Turell MJ (1989) Effect of environmental temperature on the vector competence of *Aedes fowleri* for Rift Valley fever virus. *Research in Virology* 140 (2):147-154
- Turell MJ, Perkins PV (1990) Transmission of Rift Valley fever virus by the sand fly, *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: *Psychodidae*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42(2):185-188
- Reusken C, De Vries A, Den Hartog W, Braks M, Scholte E-J (2010) A study of the circulation of West Nile virus in mosquitoes in a potential high-risk area for arbovirus circulation in the Netherlands, "De Oostvaardersplassen". *European Mosquito Bulletin* 28:69-83
- Valcárcel Y, Bastero R, Anegón M, González S, Gil A (2008) Epidemiología de los ingresos hospitalarios por leishmaniasis en España (1999-2003). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 26: 278-281
- Van Rijna PA, Geurtsa Y, Van der Spekb AN, Veldmana D, van Gennipa RG (2012) Bluetongue virus serotype 6 in The Netherlands in 2008—Emergence and disappearance of an unexpected non-virulent BTV. *Veterinary Microbiology In press*
- Vazquez A, et al. (2011) Short Report: West Nile and Usutu Viruses in Mosquitoes in Spain, 2008-2009. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85(1):178-181
- Venter GJ, Hermanides KG (2006) Comparison of black and white light for collecting *Culicoides imicola* and other livestock-associated *Culicoides* species in South Africa. *Veterinary Parasitology* 142(3-4):383-385
- Vora N (2008) Impact of anthropogenic environmental alterations on vector-borne diseases. *Medscape Journal Medical* 10: 238

- Wieserschimpf L, Foil LD, Holbrook FR (1990) Comparison of New Jersey light traps for collection of adult *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of the American Mosquito Control Association* 6(3):537-538
- Weiss RA, McMichael AJ (2004) Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. *Nature Medicine* 10 (12):70-76
- Weissenböck H, Hubalek Z, Bakonyi T, Nowotny N (2010) Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: Worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Veterinary Microbiology* 140(3-4):271-280
- Wilson A, Mellor PS, Szmaraagd C, Mertens PPC (2009) Adaptive strategies of African horse sickness virus to facilitate vector transmission. *Veterinary Research* 40(2):1-16

# Síntesis y Conclusiones

---





**Síntesis**

Este apartado, a modo de resumen, expone brevemente los principales logros y avances en el conocimiento científico obtenidos en los diferentes estudios que se conforman esta Tesis Doctoral, incluida en la línea de investigación sobre entomología aplicada al estudio de riesgos de enfermedades transmitidas por vectores.

Existe una tendencia creciente en el intercambio comercial global, en la movilidad de personas, animales y productos animales, así como en los cambios en los usos del suelo. Además, se observan alteraciones de la dinámica de las poblaciones de animales silvestres y cambios en el clima global. Todo esto afecta a las poblaciones de vectores artrópodos, y con ellos a los patógenos que transmiten, los cuales están experimentando cambios en distribución y abundancia que ponen en riesgo la salud de las personas y los animales. Evaluar estos cambios es esencial para prevenir riesgos presentes, predecir amenazas futuras y controlar los efectos indeseables ocasionados por las enfermedades transmitidas por estos vectores. Este trabajo de Tesis Doctoral pretende aportar conocimiento esencial sobre la dinámica de las poblaciones de vectores como base para la prevención de riesgos sanitarios en una región mediterránea de la península ibérica. Para ello, en este trabajo de Tesis Doctoral se ha profundizado en la monitorización de vectores del orden Diptera: *Culicidae*, *Ceratopogonidae* y *Psychodidae*, de importancia en salud pública y veterinaria en la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha. Concretamente se ha estudiado qué factores geográficos, climáticos, del hábitat y relacionados con los hospedadores determinan la abundancia de las especies de estos grupos de dípteros y, por lo tanto, con mayor potencial epidemiológico. A continuación se sintetizan los principales resultados obtenidos en los 4 capítulos que conforman este trabajo de Tesis Doctoral.

**Las poblaciones de mosquitos en ambientes acuáticos de Castilla – La Mancha son diversas, presentando una mayor abundancia en zonas húmedas del centro de la región**

En Castilla – La Mancha la información sobre las poblaciones de mosquitos era escasa e insuficiente para la generación de informes sobre riesgos sanitarios de enfermedades transmitidas por mosquitos. En el **capítulo 1** de esta Tesis se esbozó de manera general la distribución, abundancia y composición de las comunidades de mosquitos en la región mediante captura en 39 localidades pertenecientes a diferentes regiones climáticas en Castilla - La Mancha. Las capturas se realizaron mediante la colocación de trampas tipo CDC con atrayente de luz durante 3 periodos dentro de un ciclo anual: primavera-verano, verano-otoño y otoño. De los 783 culícidos adultos capturados se identificaron seis géneros diferentes: *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*, *Ochlerotatus* y *Uranotaenia*, y 19 especies. De ellos *Cx. pipiens* representó casi el 65% de las capturas y estuvo presente en 24 de las 39 localidades muestreadas. Otras especies relevantes por su abundancia y distribución geográfica fueron *Cx. theileri*, *Cs. annulata*, *Cs. subochrea* y *An. maculipennis* complex.

*Cx. pipiens*, debido a su abundancia y amplia distribución geográfica, se identificó como la especie de culícido de mayor relevancia en la región desde el punto de vista de salud pública y sanidad animal. Por lo tanto, patógenos transmitidos por *Cx. pipiens* como el virus West Nile, el virus Usutu, el virus Sindbis o el virus de la fiebre del Valle del Rift, entre otros, deben ser prioritarios en investigación debido a su mayor potencial en la región.



---

**La abundancia de *Culex pipiens*, y por lo tanto el riesgo de exposición a patógenos transmitidos por esta especie, están ligadas a factores ecogeográficos como el clima y la disponibilidad de hospedadores**

Una vez se identificó la especie de mosquito clave desde el punto de vista sanitario en Castilla – La Mancha, conocer qué factores regionales condicionan su abundancia es esencial para comprender la magnitud del riesgo sanitario y predecir las variaciones en la abundancia que se producirán con las alteraciones futuras en los parámetros condicionantes. En el **capítulo 2** se pretendió identificar algunos de estos factores ecogeográficos regionales que modulan la abundancia de *Cx. pipiens*. Para ello, una vez conocida la distribución y abundancia de *Cx. pipiens* en el trabajo realizado en el capítulo 1, se estimaron una serie de variables ecogeográficas que a priori pudiesen tener un efecto modulador de la abundancia de *Cx. pipiens*. Posteriormente, se evaluó mediante modelos estadísticos la influencia de esas variables ecogeográficas sobre la abundancia de *Cx. pipiens*. Acorde a lo descrito en el capítulo 1, las mayores abundancias de *Cx. pipiens* se registraron en el centro de la Castilla – La Mancha, una región predominantemente llana, climáticamente templada dentro del gradiente de temperatura regional y con el menor nivel de precipitaciones dentro de la región. Se identificó un pico de actividad estacional de *Cx. pipiens* coincidente con las descripciones para la especie en otras regiones geográficas y, paralelamente, se evidenció la influencia positiva del ganado doméstico y de la densidad de población humana sobre la abundancia de *Cx. pipiens*, bien por servir como hospedadores para este mosquito bien porque las actividades humanas favorecen la creación de ambientes idóneos para su reproducción. La identificación de estos factores permite a su vez

identificar algunos de los factores que modular el riesgo de exposición de personas y animales a los patógenos transmitidos por *Cx. pipiens* en la región.

***Culicoides imicola* y el grupo *C. obsoletus* parecen no ser los principales vectores de *Orbivirus* de relevancia en sanidad animal en zonas no ganaderas de Castilla – La Mancha**

La información sobre la ecología y la dinámica poblacional de las especies de jejenes del género *Culicoides* en Europa ha crecido enormemente en las últimas décadas debido a la aparición de brotes de lengua azul y peste equina africana. Sin embargo, la información obtenida está vinculada a ambientes ganaderos en los que las enfermedades transmitidas por *Culicoides* tienen un gran impacto económico, desconociéndose prácticamente cuál es la composición y abundancia de *Culicoides* en ambientes no ganaderos. El demostrado papel de los ungulados silvestres, principalmente el ciervo rojo, como reservorios del virus de la lengua azul llevó a estudiar qué especies podrían ser vectores del virus en ambientes no ganaderos. En el **capítulo 3** se describe la distribución y abundancia de jejenes del género *Culicoides* capturados en Castilla - La Mancha paralelamente a las capturas de mosquitos presentadas en los capítulos 1 y 2. Se identificó que las especies del grupo *C. pulicaris* representaron las mayores abundancias mientras que ni *C. imicola* ni ejemplares del grupo *C. obsoletus* – los vectores con mayor implicación en la transmisión del virus de la lengua azul en Europa y abundantes en ambientes ganaderos en Castilla – La Mancha – fueron capturados. Estos resultados sugieren que las especies del grupo *C. pulicaris* deben ser los vectores de *Orbivirus* más importantes en ambientes no ganaderos, poniendo en evidencia la necesidad de una

mayor investigación sobre los factores de riesgo de exposición a *Orbivirus* cuando éstos presentan un ciclo silvestre que puede estar vinculado al ciclo doméstico.

**La exposición de personas y animales a patógenos transmitidos por *Phlebotomus perniciosus* es más elevada en zonas agrícolas templadas del sur y suroeste de Castilla – La Mancha**

A pesar de que Castilla – La Mancha es una de las regiones españolas con mayor índice de hospitalizaciones por leishmaniasis y que la fauna silvestre puede jugar un papel importante como reservorio del agente causal – *Leishmania infantum* –, la distribución y composición de las especies de flebótomos vectores de este protozoo – y también de otros patógenos endémicos como el virus Toscana – en ambientes no urbanos de la región es poco conocida. En el **capítulo 4** de esta Tesis Doctoral se planteó un estudio – que discurrió de forma paralela a la captura de mosquitos y jejenes planteada en los capítulos anteriores – con la finalidad de determinar la composición, distribución y abundancia de flebótomos, y los riesgos sanitarios derivados. Una selección de los flebótomos capturados se analizó molecularmente para determinar la presencia de *L. infantum*. Se analizó la influencia de factores ecogeográficos como factores espaciales, clima, hábitat y hospedadores sobre la abundancia de la especie de flebótomo más abundante. Durante el muestreo se capturaron 142 ejemplares de *Phlebotomus perniciosus* y 10 ejemplares de *Ph. ariasi*, ambos probados vectores de *L. infantum* en la cuenca mediterránea occidental. Se detectó la presencia de ADN de *L. infantum* en 2 de los 23 pools de flebótomos analizados por PCR y el origen de los pools positivos coincidió con las zonas de mayor abundancia de flebótomos en Castilla – La Mancha. Los resultados del análisis estadístico señalaron que la abundancia de *Ph. perniciosus* –

el más abundante de los flebótomos vectores de patógenos en la región – está determinada por la presencia de zonas agrícolas en las regiones climáticas más cálidas dentro de la región, señalando que esas son las zonas con mayor riesgo de exposición a patógenos como *L. infantum* o el virus Toscana.

## Conclusiones

1. *Culex pipiens* es la especie con mayor distribución y abundancia de entre los culícidos presentes en ambientes acuáticos no urbanos del centro-sur de la península ibérica. Ello determina que los mayores riesgos para la salud pública y la sanidad animal de enfermedades transmitidas por mosquitos en estos ambientes, como el virus de West Nile o el virus de la fiebre del valle del Rift entre otros, estarían asociados principalmente a *Culex pipiens*. Así mismo, este resultado muestra cuáles son las enfermedades transmitidas por mosquitos en las que sería necesario realizar un mayor esfuerzo de investigación en el futuro en el centro-sur de la península ibérica.
2. La baja abundancia de especies del género *Anopheles* en ambientes acuáticos no urbanos del centro-sur de la península ibérica sugiere que el riesgo de establecimiento de un ciclo endémico de malaria humana causada por *Plasmodium vivax* es bajo aunque no despreciable.
3. La no detección de la especie invasora *Aedes albopictus* sugiere que esta no ha colonizado aún ambientes acuáticos no urbanos del centro-sur de la península ibérica. Ello determina que el riesgo actual de emergencia de enfermedades asociadas a este vector, como el dengue, sea bajo. Sin embargo, es necesario mantener sistemas de vigilancia ante la posible expansión de esta especie desde territorios próximos.
4. Factores ambientales como el clima y la densidad de hospedadores potenciales mamíferos condicionan la abundancia de *Culex pipiens* en ambientes acuáticos no urbanos del centro-sur de la península ibérica. Ello muestra que las regiones con mayor riesgo sanitario asociado a *Culex pipiens* en esta zona son aquellas moderadamente templadas y con abundancia de hospedadores mamíferos.
5. Los vectores más importantes del virus de la lengua azul y del virus de la peste equina africana en Europa – *Culicoides imicola* y el grupo *Culicoides obsoletus* – pueden estar presentes en ambientes no ganaderos del centro-sur de la península ibérica pero en densidades muy bajas. Ello sugiere que otras especies más abundantes en estos ambientes – como el grupo *Culicoides pulicaris* – podrían ser los vectores principales de estos y otros patógenos transmitidos por dípteros del género *Culicoides*.

6. En ambientes no urbanos del centro-sur de la península ibérica los principales vectores de *Leishmania infantum* y de virus del género *Phlebovirus* – *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi* – son más abundantes en zonas agrícolas templadas. Estas son las zonas en las que se detectó la presencia de ADN de *Leishmania infantum* en estos vectores.

# Agradecimientos

---



*Pando*





## Agradecimientos

Éste viaje que ahora termina, comenzó siendo casi como un viaje mochilero de un mes. Ahora, después de cerca de cinco años de vivir en España habrá que reconocer a todas aquellas personas que me dejaron y compartieron “algo” en el transcurso de esto que se llama tesis doctoral.

Desde que llegue a esta tierra, no me sentí desprotegido en ningún momento y el IREC siempre me refugio y abrió sus puertas. Desde antes de llegar, ya había quedado en “Atocha” con nuestra patóloga con mi billete de tren en mano para llegar a Ciudad Real. Al presentarme en el submundo, rápidamente la gente me integro a su tribu. No llevaba más de dos días y ya había estado en una ensangrentada montería, había hecho las apreciadísimas migraciones de “la Morera” y ya estaba en camino a la Sierra de Albacete.

Tenía algunas semanas como “en prácticas”, cuando “el jefe”, me habló de la posibilidad de ofrecerme una beca. Siguieron avanzando los días y días... de pronto, todo se ha pasado en un abrir y cerrar de ojos. Me quedan recuerdos, muchos recuerdos. De horas de viajes, horas en campo, horas en las carreteras, horas en *gis*, horas en “mi” despacho, horas en laboratorio, horas en necropsias. Y a pesar de tantas horas, puedo decir que mi estancia fue placentera y llena de aprendizaje. Pero, más que la formación académica, que ha sido de gran valor para mi crecimiento profesional, creo que aún más importante y de más valor para mí, fue mi desarrollo personal.

Gracias Christian especialmente por darme la oportunidad de desenvolver una etapa más de mi vida profesional y por exacerbar mi alma investigadora.

Gracias Fran porque éste trabajo se debe en gran parte a tú esfuerzo y tiempo, gracias por que a pesar de todo nunca te desesperaste del todo.

Gracias Joaquín por tus enseñanzas siempre te vi como mi hermano mayor.

Gracias Isa, siempre tan eficiente y eficaz en tu trabajo, además porque siempre que te pedí ayuda lo hiciste de buena manera.

Gracias a Pela por sus múltiples colaboraciones “espacio tridimensionales” y por tus lecciones.

Gracias a Maripaz por esos inicios patológicos y por que fue mi madrina de inicio al IREC.

Quiero agradecer la Dra. Isabel García Fernández de Mera y al Dr. Diego Villanúa Inglada por colaborar como revisores externos.

A Tania, *pinche* Tania, Luca y Cate. Se vivieron muchas cosas con los *ragazzi*, desde los comienzos de las ya famosas, biodiversas y glamorosas “cenas internacionales”, pasando por acampadas, algunos días de escalada y hasta las frías sangrientas pero alegres monterías.

A Raquel Sobrino, Sandra, Cristina, Raquel Jarosos, Mariana Elisa y Ricardo por ser mis *carnales* de camada.

A Bea por animar el despacho y ser la esencia que atiende y escucha. A José por los encarnizados juegos de padel y por alborotar al gallinero *-En esos campos no quedaba ni una flor !*. A Marina, David, las Virginias e Iratxe por su compañía, aunque ya no tuve la oportunidad de trabajar mucho con ustedes.

A Joao Luis mi compañero de carreras y del primer *tour* caza mosquitos a Lucia por su ayuda y compañía en la segunda fase caza mosquitos.

A Joao Pedro, Lisa y a los cuates chilenos (Xavier y Zandra), no cabe duda que en la vida te encuentras con gente muy valiosa.

Gracias a Valeria mi compañera de viaje de la vida, gracias por compartir y crecer juntos. Siempre disfrutando de estos años.

A Encarni por su eficiente trabajo y su alma materna no solamente con las pesetas. A Vidal por su ayuda y sugerencias. A Paqui y Pablo que siempre están dispuestos a  *echar una mano*, ellos son parte fundamental del equipo.

A toda la gente de toxicología, genética y ecología. A la valiosa ayuda de la gente no zoófila como Jorge Yepes, la lustrosa Emilia y la gente de administración sobre todo Lucia y Mercedes.

En general al pueblo español, que a través de la UCLM me ofreció una beca durante estos años. Me llevo muchos recuerdos y buenas cosas aprendidas de ésta tierra y de su gente.

El aprendizaje que te da la vida fuera de tu país, de tú tierra de tú cultura es enorme. Vislumbrar a México desde fuera me hizo comprenderlo, extrañarlo en ocasiones repelerlo pero sobre todo valorarlo. Desde luego no soy la misma persona que llegó, he madurado y afinado mis ideales, he reafirmado mis convicciones. Sé lo que quiero y lo tengo claro.

Dicen que la mirada del ser humano es su arma más poderosa, pues es ahí por donde se asoma el alma. Así que, más que escribir y agradecer a cada uno, prefiero tener contacto y con una mirada en los ojos y un abrazo agradecer a la gente que echare de menos.



