



Universitat de les Illes Balears
Departamento de Biología
Área de Zoología

**ESTRATEGIAS DE CONTROL Y COMPETENCIA VECTORIAL DE LAS
ESPECIES DE *CULICOIDES* VECTORES DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL
EN PENÍNSULA IBÉRICA Y BALEARES**

Tesis Doctoral para optar al Grado de

Doctor por la *Universitat de les Illes Balears*

Programa de doctorado de Biología
del Departamento de Biología de la UIB

Presentada por:

Ricardo del Río López

Palma de Mallorca, Mayo de 2012

Con el Beneplácito del Director:

Dr. Miguel Ángel Miranda Chueca

Titular de Universidad del área de Zoología, Departamento de Biología UIB

El interesado:

Ricardo del Río López

A mis padres

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido, de una u otra manera, a la realización de esta tesis.

En primer lugar, quiero expresar mi gratitud a mi director de tesis, el Dr. Miguel Ángel Miranda, por su comprensión, su apoyo en los momentos de desánimo, y por la confianza depositada en mí en todo momento.

A todos los profesores del laboratorio de Zoología, los doctores Aina Alemany, Luis Gállego, Ana María Abril y Claudia Paredes, por el interés mostrado por mi trabajo y por sus buenos consejos.

Thanks Dr. Gert Venter for giving me the opportunity to work in your group and all the interest you have showed in me. Thanks to all the people in your group, especially to Solly Boikanyo, Daphne Majatladi, Ina Hermanides and Heloise Heyne for making my stay in South Africa such a nice experience. Thanks also to Eva Veronesi, for sharing with me amazing and sometimes “dangerous” experiences in Mpumalanga land.

Merci a Bruno Mathieu et Thomas Balenghien pour me recevoir dans son groupe de travail et de se préoccuper par moi à tout moment. Merci aussi à tout le monde dans le group, spécialement a Marie Laure Setier et Roger Venail pour me faire sentir aussi bien à Montpellier qu’en maison.

A mis amigos, especialmente a Miguel Ángel Frontera, Jordi Suria y Juan Miguel Seguí por estar ahí después de tantos años Al “Canario” (Mariano Garijo) y “Dimitri” (Dmitiy Bishayev) por mantenerme en forma a pesar de las largas horas que he pasado sentado delante del ordenador. A mis compañeros de laboratorio, que a lo largo de estos años se han convertido en grandes amigos, Miriam Monerri, Marga Miquel y David Borràs, por su inestimable colaboración en el presente trabajo y a Ana González y Mar Leza.

Un agraïment molt especial a sa meva Marga, que m'ha hagut d'aguantar durant els moments més difícils d'aquesta tesi i m'ha ajudat fins al final. Gràcies amor meu. T'estimo.

A todo el personal de Administración y Servicios de la UIB, gracias por hacer que nuestro laboratorio, nuestra conserjería y nuestro edificio funcionen.

A mi familia, especialmente a mis padres a quienes dedico este trabajo y que sin su ayuda no habría sido posible.

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la financiación de la *Conselleria d'Innovacio Interior i Justicia* y a la *Universitat de las Illes Balears*.

Ricardo del Río López
Palma de Mallorca, Mayo 2012

Contenidos

Resumen.....	1
1. Introducción	7
1.1 Características del Virus de la Lengua Azul	8
- Estructura	9
- Patogenicidad.....	9
1.2 Distribución del Virus de la Lengua Azul	9
- Factores que influyen en la Prevalencia y Distribución del VLA	9
1.3 Ciclo de transmisión de la enfermedad.....	10
- Hospedadores de la enfermedad	11
1.4 Culicoides spp. Vector Biológico de la Enfermedad de la Lengua Azul	12
- Posición taxonómica	12
- Transmisor de patógenos.....	13
- Género Culicoides	13
- Morfología	13
- Alimentación.....	18
- Vuelo	18
- Distribución y Hábitats	19
- Importancia como vector.....	19
1.5 Ciclo biológico del vector.....	20
- Ciclo de desarrollo	20
- Ciclo gonotrófico.....	21
1.6 Principales especies de vectores implicados en la transmisión del VLA en España.	22
- C. imicola	23
- Complejo Obsoletus.....	23
1.7 Detección de especies vectoras potenciales	24
- Capacidad vectorial	25
- Competencia vectorial.....	25
- Determinación experimental de la competencia vectorial	26
- Barreras a la transmisión biológica de arbovirus	26
1.8 Importancia económica e impactos	27
1.9 Incursiones de la enfermedad	28
1.10 Distribución de la enfermedad en Europa.....	29
- Brotes de Lengua Azul en España	30
1.11 Curso de la enfermedad.....	32
1.12 Diagnóstico	32
- Detección del VLA en vertebrados	32
- Detección molecular.....	32
1.13 Control de la enfermedad.....	33
- Control de Vectores.....	33
- Vacunación	36
1.14 Programa de erradicación y vigilancia de la lengua azul.....	36
- Programa de vigilancia serológica	37

- Programa de vigilancia entomológica	37
1.15 Hibernación del virus y de los vectores. Implicaciones epidemiológicas	37
2. Objetivos del Estudio	39
3. Comparación de sistemas de seguimiento y captura de especies de <i>Culicoides</i> spp. vectoras del Virus de la Lengua Azul asociadas a explotaciones ganaderas de las Islas Baleares	43
3.1 Introducción	45
3.2 Material y Métodos	46
3.3 Resultados	51
3.4 Discusión	65
4. Recovery rates of bluetongue virus serotype -1, -2, -4 and -8 Spanish strains from orally infected <i>Culicoides imicola</i> in South Africa	73
4.1 Abstract	77
4.2 Introduction	77
4.3 Material and Methods	79
4.4 Results	81
4.5 Discussion	82
4.6 Acknowledgments	85
5. Estudio de sensibilidad de <i>Culicoides</i> spp. a la deltametrina	87
5.1 Resumen	89
5.2 Introducción	90
5.3 Determinación de la sensibilidad de <i>Culicoides</i> spp. adultos a la Deltametrina mediante la utilización de cámaras de ensayo de la OMS	97
5.3.2 Material y Métodos	100
5.3.3 Resultados	104
5.3.4 Discusión	107
5.4 Estudio de la sensibilidad de <i>Culicoides</i> spp. a mallas impregnadas con Deltametrina mediante la utilización de cámaras de ensayo de la OMS.....	107
5.4.1 Material y Métodos	109
5.4.2 Resultados	110
5.4.3 Discusión	112
5.5 Evaluación de la eficacia en condiciones de campo de mallas tratadas con deltametrina en el control de <i>Culicoides</i> spp.	117
5.5.1 Material y Métodos	119
5.5.2 Resultados	121
5.5.3 Discusión	127
6. Recapitulación	131
7. Conclusiones	139
8. Bibliografía	146
9. Anexo	187
9.1 Manuscrito I	179
9.2 Manuscrito II	187
9.3 Manuscrito III	215
9.4 Formación científica durante el periodo de tesis	235
9.5 Datos originales del trabajo	véase CD adjunto
9.6 Artículos publicados	véase CD adjunto

Listado de Figuras

Figura 1. <i>Arquitectura de una partícula del virus de la Lengua Azul mostrando la localización de las proteínas estructurales VP3, VP7, VP2 y VP5 y de las proteínas enzimáticas VP1, VP4 y VP6. (Adaptado de Mertens et al., 2009)</i>	8
Figura 2. <i>Esquema de una hembra adulta del género Culicoides mostrando los principales criterios de clasificación de especies (Adaptado de Arnaud, P.H., 1956).</i>	14
Figura 3. <i>Aspecto general de hembra de Culicoides imicola (Foto: David Borràs; IBABSA)</i>	15
Figura 4. <i>Visión frontal de la cabeza de Culicoides realizada mediante microscopio electrónico de barrido en donde se aprecian los artejos antenales con sus sensilas, ojos, palpos maxilares con fosetas sensoriales y piezas bucales (Foto: del Río, R.)</i>	16
Figura 5. <i>Alas de distintas especies de Culicoides en las que se puede apreciar las diferencias de los patrones de manchas (Fuente: CReSA)</i>	17
Figura 6. <i>Venación alar del género Culicoides con la terminología utilizada en la determinación taxonómica (Adaptado de Rawlings, P., 1996)</i>	17
Figura 7. <i>Ciclo biológico típico del género Culicoides (Modificado de J.C. Delécolle 1994)</i>	21
Figura 8. <i>Distintos estados gonotróficos de C. obsoletus. De izquierda a derecha: nulípara, para, grávida y alimentada de sangre (Foto: David Borràs, IBABSA).</i>	22
Figura 9. <i>Esquema de la pared celular del insecto mostrando las posibles barreras a la infección por orbivirus. En A el VLA pasa del lumen a la célula donde se multiplica y después sale de ella para diseminarse en el hemocele del insecto. En B el VLA no es capaz de infectar la célula. En C el VLA infecta la célula pero queda retenido en ella y no se disemina. En D el VLA pasa directamente al hemocele del insecto sin infección celular previa (Adaptado de Beaty y Marquardt, 1996).</i>	27
Figura 10. <i>Mapa de zonas de restricción al movimiento de animales debido al virus de la Lengua Azul en Europa (actualizado el 16 de marzo del 2012), en donde se representa los distintos serotipos del virus circulando en los diferentes países y regiones. (Fuente: EFSA)</i>	30
Figura 11. <i>Mapa en el que se muestran las zonas de restricción al traslado de animales sensibles a la LA utilizado para elaborar los planes de vacunación contra los distintos serotipos en la Península Ibérica (Fuente: RASVE 2012)</i>	31
Figura 12. <i>Fotos de las cuatro trampas utilizadas en el estudio (Fotos: Dr. Gert Venter, Instituto Veterinario de Onderstepoort)</i>	48

Figura 13. Esquema de la distribución de las trampas y los animales en la finca agrícola. Con los puntos rojos se designan las posiciones de las trampas junto con el número de referencia. Las cajas indican las instalaciones en donde se mantenían a los animales.	49
Figura 14. Media de capturas de Culicoides junto con su error estándar en las diferentes trampas durante el periodo de muestreo del 18-10 al 19-11 de 2007.	51
Figura 15. Número de Culicoides por trampa y noche para cada una de las trampas ensayadas en el periodo del 18-10-07 al 19-11-07 (1 ^{er} ensayo). El 8/11/2007 se incluyó la trampa inglesa (Pirbright) en el ensayo.	52
Figura 16. Media de capturas totales de Culicoides junto con su error estándar en las diferentes trampas durante el primer periodo del 2 ^o ensayo (18/02 al 14/04 de 2008).	55
Figura 17. Número total de Culicoides por trampa noche para cada una de las trampas (18/02 al 14/04 de 2008).	56
Figura 18. Media de la captura de Culicoides junto con su error estándar en las diferentes trampas durante el segundo periodo del 2 ^o ensayo (16/04 al 5/06 de 2008).	58
Figura 19. Número total de Culicoides por trampa noche para cada una de las trampas (16/04 al 05/06 de 2008).	59
Figura 20. Media de Capturas de Culicoides junto con su error estándar en las diferentes trampas durante el 3 ^{er} ensayo (1/10 al 20/11 de 2008)	61
Figura 21. Número total de Culicoides por trampa noche para cada una de las trampas (01/10 al 17/11 de 2008).	62
Figura 22. Batería de ensayo de cinco concentraciones de deltametrina (0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005 y 0.01%) (puntos rojos) más el control (punto verde)	97
Figura 23. Protocolo para determinar la sensibilidad de Culicoides spp. a la deltametrina utilizando las cámaras de la OMS (Adaptado de Venail y col. 2009)	98
Figura 24. Modelo de distribución de individuos muertos según dosis. Se muestran los resultados de mortalidad de los ensayos y el modelo de distribución que se ajusta a la dispersión de los datos con sus intervalos de confianza del 95%. En el eje X se representa el log de la dosis utilizada y en el eje Y la mortalidad a las 24h post-exposición en tanto por uno. Se indican las DL_{50} y DL_{90}	101
Figura 25. Línea LogDosis-Probit (Ld-P) de la población de Culicoides ensayada. La línea punteada (gris) representa los puntos experimentales, mientras que la línea continúa (negra) representa la línea de regresión (Ld-P)	101
Figura 26. Malla tratamiento montada sobre la estructura metálica y fijada al terreno en donde puede apreciarse la trampa Onderstepoort en su interior y la base blanca de polietileno	120

Figura 27. *Recuento de capturas de Culicoides muertos y vivos durante las noches de muestreo junto con su error típico separados por tratamiento y sitio de ubicación de las trampas124*

Figura 28. *Porcentaje de supervivencia de las capturas de Culicoides en cada una de las trampas de ensayo durante once noches de muestreo.126*

Listado de Tablas

Tabla 1. <i>Número de muestreos por trampa (N), número total de capturas y media de capturas por noches ($\bar{\chi}$) junto con su error estándar (S.E.). Porcentaje de las especies de Culicoides capturados en las trampas durante el 1er ensayo (18 de octubre-19 de noviembre 2007) y en comparación con las otras tres trampas.</i>	53
Tabla 2. <i>Número de muestreos por trampa (N), número total de capturas y media de capturas por noches junto con su error estándar ($\bar{\chi} \pm S.E.$). Porcentaje de las especies de Culicoides capturados en las trampas durante el 1er periodo (18/02 al 14/04 de 2008) del 2º ensayo y en comparación con las otras tres trampas</i>	57
Tabla 3. <i>Número de muestreos por trampa (N), número total de capturas y media de capturas por noches junto con su error estándar ($\bar{\chi} \pm S.E.$). Porcentaje de las especies de Culicoides capturados en las trampas durante el 2º periodo (16/04 al 5/06 de 2008) del 2º ensayo y en comparación con las otras tres trampas.</i>	60
Tabla 4. <i>Número de muestreos por trampa (N), número total de capturas y media de capturas por noches junto con su error estándar ($\bar{\chi} \pm S.E.$). Porcentaje de las especies de Culicoides capturados en las trampas durante el 3er ensayo (1/02 al 20/11 de 2008) y en comparación con las otras tres trampas.</i>	63
Tabla 5. <i>Porcentaje de Culicoides del complejo <i>Obsoletus</i> capturados en cada una de las trampas durante tres periodos del año de 2008.</i>	64
Tabla 6. <i>Virus serotypes, year of isolation and passage history of the Spanish BTV isolates used for the oral infection of field collected Culicoides midges.....</i>	80
Tabla 7. <i>Virus recovery rates and titres in field collected Culicoides imicola, C. bolitinos, C. enderleini and C. nevillei maintained for 10 days at 23.5°C after feeding on blood containing different serotypes of BTV</i>	82
Tabla 8. <i>Concentraciones de deltametrina utilizadas en el ensayo. Número de individuos ensayados con sus medias y desviaciones estándar (DE) y porcentajes de mortalidad obtenidos a la hora y a las 24h con sus correspondientes desviaciones estándar.....</i>	100
Tabla 9. <i>Tiempos de exposición a los que se sometieron los ejemplares de Culicoides spp. Nº de individuos que sobrevivieron y murieron en el ensayo control. Número de réplicas realizadas para cada tiempo de exposición (N) y media más desviación estándar de los individuos vivos y muertos después de la exposición insecticida. Porcentaje de eficacia insecticida de la deltametrina en las mallas a los 6 y a los 40 minutos.</i>	111
Tabla 10. <i>Composición del número total de Culicoides capturados en trampas control y tratamiento según especie junto con su porcentaje relativo del total de capturas.....</i>	123

Tabla 11. Estado gonotrófico del total de especies de Culicoides capturadas en las trampas control y tratamiento con su porcentaje relativo al total de capturas..... 123

Tabla 12. Capturas de la trampa situada exteriormente a la zona de muestreo y de las trampas control y tratamiento. Se muestra el porcentaje relativo de capturas de las trampas de la zona de muestreo en relación a las capturas en la trampa exterior. 124

Tabla 13. Número de ensayos (N), capturas totales, media de capturas por noche y porcentaje de capturas en las trampas con malla control y sin malla. 125

Listado de Abreviaturas

a.s.l.	Above Sea Level
AGL	Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias
am	ante meridiem
ANOVA	ANalysis Of VAriance
ARC	Agricultural Research Council
BHC	Benzeno Hexaclorado
BHK	Baby Hamster Kidney
BIIM	Barrera a la Infección del Intestino Medio
BT	Bluetongue
BTV	Bluetongue Virus
C.	<i>Culicoides</i>
C/n	<i>Culicoides</i> por noche
CDC	Centers for Disease Control
CIRAD	Centre Internationaux de Recherche Agronomique pour le Développement
CITA	Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de Carbono
Compl.	Complejo
col.	Colaboradores
CReSA	Centre de Recerca en Sanitat Animal
D.E.	Desviación Estándar
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DEET	N,N-Dietil-meta-toluamida
d.f.	Degrees of Freedom
dif.	Diferencia
DL	Dosis Letal
Dr.	Doctor
E	Este
EDEN	Emerging Diseases in a changing European eNvironment
EE.UU.	Estados Unidos
EFSA	European Food Safety Authority
ej.	Ejemplo
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
etc.	Etcétera
fig.	Figura
FL	Florida
g	gramo
h.	Horas
H.R.	Humedad Relativa
i.e.	<i>id est</i>
IAH	Institute for Animal Health
IBABSA	Institut de Biologia Animal de Balears
INIA	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria

IU	Infective Units
IUNICS	Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud
kg	Kilogramo
Km	Kilómetros
L.	Linnaeus
LD-P	Logaritmo de la Dosis-Probit
Log.	Logaritmo
LSD	Least Significant Difference
m/s	metros por segundo
m ²	Metros cuadrados
m ³ /min	Metros cúbicos por minuto
MedReoNet	Surveillance Network of Reoviruses, Bluetongue and African Horse Sickness, in the Mediterranean Basin and Europe
mg/h	Miligramos por hora
min.	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
MM	Mosquito Magnet
mm ²	Milímetros cuadrados
µm	Micrómetros
N	Norte
Nº	Número
NS	Neutralización Sérica
°C	Grados Centígrados
OF	Organofosforado
OIE	Oficina Internacional de Epizootias
OMS	Organización Mundial de la Salud
OVI	Onderstepoort Veterinary Institute
p/v	Peso/Volumen
pág.	Página
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIE	Periodo de Incubación Extrínseco
PII	Periodo de Incubación Intrínseco
pm	Post meridiem
PMD	Para-metano-3,8-diol
PS	Piretroide Sintético
R.U.	Reino Unido
RASVE	Red de Alerta Sanitaria Veterinaria
REVEP	Red de Estaciones de Vigilancia Entomológica Permanente
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
S	Sur
S.E.	Standard Error
s.s.	<i>Sensu Stricto</i>
SPA	Spain
spp.	Especies
TCID	Tissue Culture Infective Dose
TL	Tempo Letal
U. inf.	Unidades Infecciosas

U.E.	Unión Europea
U.V.	Ultra Violeta
UIB	Universitat de les Illes Balears
V	Voltios
var.	Variedad
VLA	Virus de la Lengua Azul
W	Wattios
w/v	Weight/Volume
WHO	World Health Organization
\bar{x}	Media Aritmética
#	Número

RESUMEN

El Virus de la Lengua Azul (VLA) es un arbovirus de la familia Reoviridae que afecta a rumiantes tanto domésticos como silvestres y cuyos síntomas clínicos severos se manifiestan principalmente en ovejas de raza europea. La enfermedad producida por el VLA supone un grave impacto económico debido a la mortalidad y morbilidad que provoca en los animales infectados, la disminución de la producción y gastos asociados a la enfermedad, y a la pérdida de comercio originada por la inmovilización de animales y sus derivados. El VLA se ha establecido en Europa desde 1998, extendiéndose progresivamente en su distribución. En la Unión Europea se ha desarrollado un programa de vigilancia y control para limitar la expansión de la enfermedad y reducir su incidencia. Los estudios realizados en el presente trabajo se han desarrollado en acuerdo con las líneas de actuación del proyecto nacional del antiguo Ministerio de Ciencia (INIA-AGL; 2009-07353) y de los proyectos europeos MedReoNet y EDENext.

El presente trabajo comprende cinco estudios. En el primero se realizó una comparación de trampas de luz para la captura de *Culicoides*. Las trampas comparadas fueron: Onderstepoort (Sudáfrica), mini-CDC (EE.UU.), Pirbright (R.U.) y Rieb (Francia). Se realizaron en total tres ensayos, dos en otoño-invierno y otro en primavera, por lo que se pudo obtener datos en diferentes momentos del ciclo anual de *Culicoides*. La trampa Onderstepoort fue la más eficiente en la captura de *Culicoides* durante la época otoñal ($\approx 65\%$ del total de capturas), coincidiendo con el pico poblacional del vector *C. imicola*, mientras que durante la primavera, cuando el vector principal es el complejo *Obsoletus*, la trampa mini-CDC fue la que obtuvo un mayor número de capturas ($\approx 50\%$ del total). También se pudo comprobar que la trampa Onderstepoort fue la más eficiente a la hora de capturar *Culicoides* en condiciones de baja densidad poblacional (66.6% del total de capturas). Estos datos pueden ser utilizados para determinar el periodo de “bajo riesgo de transmisión” en áreas susceptibles a incursiones del VLA.

El segundo estudio se llevó a cabo en el Instituto Veterinario de Onderstepoort en Sudáfrica, zona donde predomina el vector *C. imicola*. En este estudio se determinó la

capacidad de poblaciones de esta especie para infectarse con cuatro serotipos víricos aislados en España (VLA1, -2, -4 y -8). La infección oral con estos serotipos se realizó mediante la alimentación de los insectos a través de membranas. El virus fue recuperado en <1% de los *Culicoides* analizados después de 10 días de incubación extrínseca. Se obtuvieron títulos víricos $>2.5 \log_{10}$ TCID₅₀/insecto en dos de los serotipos ensayados (VLA1 y VLA2), lo que sugiere que tuvieron lugar procesos de replicación vírica en el interior del insecto y que la transmisión de estos dos serotipos a animales susceptibles sería posible. VLA4 fue recuperado a una concentración ($2.4 \log_{10}$ TCID₅₀/insecto) muy cercana al umbral de transmisión ($2.5 \log_{10}$ TCID₅₀/insecto). La baja capacidad relativa de *C. imicola* a infectarse oralmente con distintos serotipos del VLA apoya estudios realizados con anterioridad e indica que otras especies de *Culicoides* pueden tener un papel importante en la epidemiología de la LA.

En el tercer, cuarto y quinto estudio se ensayó la eficacia del piretroide deltametrina sobre poblaciones de *Culicoides* presentes en Mallorca. En el tercer estudio se ensayó la sensibilidad de varias especies de *Culicoides* a papeles impregnados con distintas concentraciones de deltametrina (0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005 y 0.01%) mediante la utilización de cámaras de la OMS y se analizó el efecto insecticida inmediato y después de 24 h. Los resultados indicaron que las distintas especies de *Culicoides* son muy sensibles a la deltametrina ya que concentraciones del 0.000145 y 0.000579 % fueron suficientes para matar al 50 y 90 % de la población respectivamente.

En el cuarto estudio se evaluó la capacidad insecticida de mallas comerciales tratadas con deltametrina sobre *Culicoides* spp. En este estudio, se utilizaron porciones de mallas tratadas con una concentración de deltametrina de $4.4\text{g/kg} \pm 15\%$. Varias especies de *Culicoides* fueron expuestas a estas mallas en cámaras de la OMS durante intervalos de tiempo cada vez menores hasta encontrar las tasas de supervivencia de los individuos ensayados. Las mallas demostraron una alta efectividad insecticida sobre *Culicoides* spp. en laboratorio y exposiciones de tan solo 10 segundos fueron suficientes para eliminar el 100% de la población. El tiempo transcurrido en presentar efectos claros de intoxicación al insecticida en la mayoría de la población expuesta (>70%) fue de ≈ 6 minutos. La instalación de estas mallas en el interior de los establos en zonas de riesgo de transmisión podría reducir sensiblemente la infección de los animales susceptibles con el VLA.

El quinto y último estudio determinó la eficacia de las mallas insecticidas en ensayos de campo. Para ello se utilizaron dos trampas de tipo Onderstepoort que se instalaron sobre sendas estructuras metálicas que se rodearon de malla por todos sus lados. Se comparó la eficacia de una malla impregnada con deltametrina a una concentración de $4.4\text{g/kg} \pm 15\%$ en relación a una malla control durante un periodo de doce noches. Los resultados del estudio indicaron que no existían diferencias significativas en la colección de *Culicoides* en las trampas. Por el contrario, se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de supervivencia de las capturas entre malla tratamiento y control, siendo la supervivencia de los *Culicoides* en las trampas con malla insecticida un 22.8% inferior a la de la malla control. Las mallas con deltametrina utilizadas en el presente estudio podrían ofrecer protección a los animales tanto dentro como fuera de los establos.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida como Lengua Azul o Fiebre Catarral Ovina

La Lengua Azul o **Fiebre Catarral Ovina** es una enfermedad producida por un arbovirus (virus transmitido por artrópodos) denominado Virus de la Lengua Azul (VLA) que infecta de forma natural a rumiantes domésticos y salvajes (Barnard, 1997). Sin embargo, los síntomas severos de la enfermedad solo se manifiestan en ciertas razas de ovejas y ciervos y, ocasionalmente, en el ganado bovino (Taylor, 1986; MacLachlan, 1994). Este virus es transmitido de forma casi exclusiva mediante las picaduras de las hembras de varias especies del género *Culicoides*, dípteros nematóceros que se incluyen en la familia de los Ceratopogónidos (Mellor *et al.*, 2000)

La enfermedad ocasionada por el VLA puede causar brotes con elevada morbilidad y mortalidad en el ganado ovino y es una enfermedad de declaración obligatoria, según recoge la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), debido al potencial que tiene de expandirse a países vecinos y por el severo impacto que los brotes de la enfermedad pueden causar en los hospedadores susceptibles así como en el comercio internacional de animales y sus productos (OIE, 2005).

La enfermedad provocada por este patógeno fue descrita por primera vez por el biólogo francés François de Vaillant durante sus viajes a Ciudad del Cabo (Sudáfrica) entre 1781 y 1784, tras la introducción de ovejas merinas de origen europeo (Gutsche, 1979; Verwoerd *et al.*, 2004). En 1943 Du Toit llevó a cabo el primer experimento en el que demostraba la transmisión de la enfermedad mediante la picadura de hembras de la especie *C. imicola* infectadas con VLA a ovejas susceptibles (Du Toit, 1944). De esta manera quedó establecida la naturaleza viral de la enfermedad y su transmisión a través del insecto (Howell, 1970).

Varias especies del género *Culicoides* actúan como vectores biológicos del virus de la LA. De las aproximadamente 1400 especies de *Culicoides* descritas a nivel mundial (Borkent y Wirth, 1997), menos de 20 son consideradas vectores reales o potenciales (Mellor *et al.*, 1990) y cinco de ellas pertenecen al subgénero *Avaritia*, en el que se incluye la especie *C. imicola* (Coetzer *et al.*, 1994).

1.1 Características del Virus de la Lengua Azul

El virus de la Lengua Azul es un virus de ARN de doble cadena que pertenece al género *Orbivirus* y se incluye dentro de la familia Reoviridae.

- Estructura

El virus presenta forma icosaédrica y consiste en un genoma de ARN bicatenario segmentado, encapsulado por una envuelta proteica de doble capa, que se replica en el citoplasma celular (Fig. 1) (Knudson y Shope, 1985).

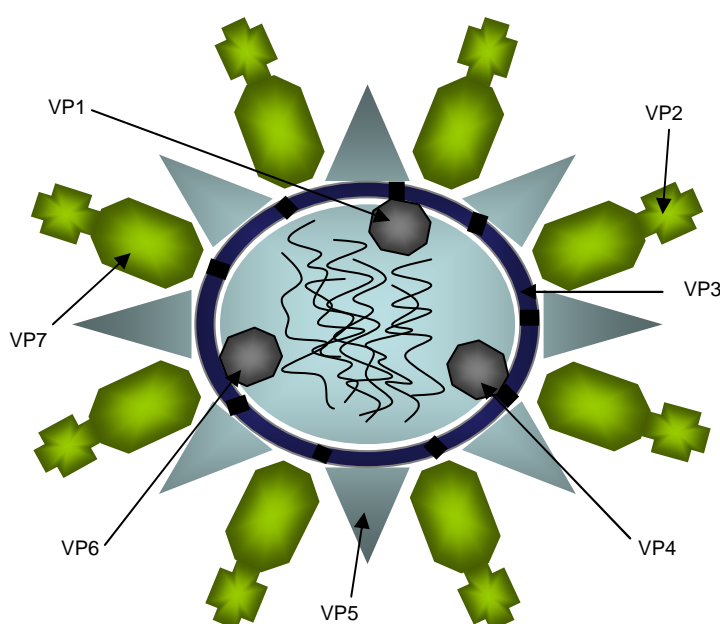


Figura 1. Arquitectura de una partícula del virus de la Lengua Azul mostrando la localización de las proteínas estructurales VP3, VP7, VP2 y VP5 y de las proteínas enzimáticas VP1, VP4 y VP6. (Adaptado de Mertens *et al.*, 2009)

Hoy en día se reconocen hasta 24 serotipos del virus y dos serotipos más están siendo considerados actualmente (Hofmann *et al.*, 2008b; Maan *et al.*, 2011). La mayoría se encuentran en África y la India con alrededor de unos 20 serotipos cada uno (Verwoerd *et al.*, 2004).

Cada región del planeta afectada por la enfermedad de la LA presenta un número de serotipos específico que suelen repetirse en los distintos brotes de la enfermedad. Ello ha llevado a dividir las regiones afectadas en cinco diferentes “episistemas” (definidos

como sistemas complejos en donde interactúan factores biológicos, ambientales y socioeconómicos que afectan la emergencia y expansión de una enfermedad infecciosa) (Tabachnick, 2004). De esta forma, el episistema del Mediterráneo y países de Oriente próximo comprende al menos ocho serotipos.

- *Patogenicidad*

Los distintos serotipos del VLA pueden presentar diferente grado de patogenicidad y virulencia para el hospedador. En general se conoce que los serotipos del virus -1, -2, -3, -4, -6 y -10 poseen un alto índice patogénico y un elevado potencial epidémico (Dungu *et al.*, 2003). La razón por la cual los arbovirus no suelen producir el mismo daño en las células del insecto como el que causan en las células del mamífero no está del todo clara, pero podría estar relacionado con el diferente mecanismo que utilizan las partículas víricas en un caso o en otro para salir de las células infectadas (Mellor *et al.*, 2009).

1.2 Distribución del Virus de la Lengua Azul

La distribución del VLA en la naturaleza está influenciado por factores tanto bióticos (variabilidad serotípica del virus y sus variaciones biológicas y bioquímicas) como abióticos (efectos climáticos y ambientales). En principio, la distribución geográfica del VLA se encuentra restringida a aquella que presenta el insecto vector. Del mismo modo, las preferencias sobre el rango de hospedadores de los que se alimentan las especies de *Culicoides*, influye en la distribución geográfica del virus.

- *Factores que influyen en la Prevalencia y Distribución del VLA*

- Climatología: La temperatura es el factor más influyente, debido a que los *Culicoides* adultos son activos únicamente en un rango determinado de temperaturas, que es característico para cada especie (Wittmann, 2000). La temperatura además regula el ciclo de replicación del virus en el vector (Periodo de Incubación Extrínseco), y a temperaturas inferiores a 15°C el virus deja de replicarse en el interior del insecto.

- Vectores: la prevalencia y distribución del virus se ve afectada por la abundancia, distribución, preferencia de hospedador sobre el que alimentarse y por la competencia vectorial del insecto (Gibbs y Greiner, 1994).
- Hospedadores: La distribución de los hospedadores y su capacidad para desarrollar viremias a altos niveles, como es el caso del ganado bovino (Metcalf y Luedke, 1980).

1.3 Ciclo de transmisión de la enfermedad

El virus de la Lengua Azul se ha desarrollado de manera que se producen ciclos alternos de replicación en hospedadores vertebrados e invertebrados. Hasta la fecha, la principal vía de transmisión que se ha demostrado es la de tipo horizontal, a través de las picaduras de distintas especies del género *Culicoides*.

El **ciclo de transmisión** del virus se inicia con la picadura de un *Culicoides* hembra infectado sobre un animal sano. En cada picadura los vectores inoculan el virus presente en su saliva a los hospedadores vertebrados. La replicación del virus tiene lugar en los nódulos linfáticos regionales y en tejidos linfo-reticulares, el endotelio y otras células que rodean los capilares, las arteriolas y las vénulas (Gibbs y Greiner, 1994). Una vez se ha producido la replicación en las células diana, el virus aparece en el torrente sanguíneo y se extiende afectando a todos los órganos. Inicialmente el virus se asocia a leucocitos y eritrocitos (viremia asociada a células) (MacLachlan, 1994). Sin embargo, el virus no se replica en los eritrocitos, por lo que la duración de la viremia se asocia, en parte, a la vida útil de estas células. Aunque la duración media de las viremias en ovejas y terneros es de unas pocas semanas (Koumbati *et al.*, 1999; Bonneau *et al.*, 2002; Gubbins *et al.*, 2008), en algunos animales, como los terneros, las viremias pueden durar hasta 100 días (Sellers, 1980; MacLachlan *et al.*, 1990; MacLachlan *et al.*, 1991). La Oficina Internacional de Epizootias recoge que la viremia de la mayor parte de ganado es menor de cuatro semanas con menos de un 1 % que excede de las ocho semanas.

Para que haya transmisión, el virus debe replicarse en el hospedador vertebrado hasta alcanzar un nivel mínimo de viremia y poder ser ingerido en cantidad suficiente por un vector susceptible. Viremias suficientes para transmitir el virus a los vectores las alcanzan los ovinos ($10^{4.4}$ U. inf/ml), los bovinos y los caprinos ($10^{4.5}$ U. inf/ml) (OIE, 1998).

Cuando la sangre infectada es absorbida por los vectores, el virus se adhiere a moléculas receptoras asociadas a las membranas de las células epiteliales del tracto digestivo del insecto y, seguidamente, se internan en la célula. En la primera fase de la infección, el virus se replica activamente en el interior de las células epiteliales cuboidales del intestino delgado para después, atravesar de nuevo la pared celular y ser liberado en el hemocele del insecto, a través del cual se diseminará y podrá infectar tejidos diana secundarios, como son las glándulas salivares. La fase final de la infección se produce cuando los viriones invaden las células de las glándulas salivares del insecto, fenómeno que ha sido claramente demostrado mediante estudios de microscopía electrónica (Bowne y Jones, 1966). La eficacia de esta virogénesis depende de la temperatura exterior, siendo la temperatura óptima superior a 25°C, mientras que a temperaturas inferiores a 12-15°C el virus no se replica.

El período comprendido entre la ingestión de sangre infectada y la aparición del virus en la saliva del vector se denomina **Periodo de Incubación Extrínseco (PIE)**, y su duración aproximada es de una a dos semanas dependiendo de la temperatura exterior. A partir de ese momento, las glándulas salivares del *Culicoides* estarán infectadas, algunas partículas víricas se alojarán en los conductos salivares y el vector estará en condiciones de poder transmitir el virus sobre un nuevo hospedador vertebrado (Beaty y Marquardt, 1996). Del mismo modo, el **Periodo de Incubación Intrínseco (PII)** es el tiempo transcurrido desde que se produce la infección en el hospedador vertebrado hasta que se observan los primeros síntomas clínicos de la enfermedad.

- Hospedadores de la enfermedad

El VLA es patogénico sobretodo en ovino, y en particular en algunas razas de ovejas seleccionadas, como la Merina, así como para algunas especies de ciervos (Taylor, 1986). Durante un extenso estudio realizado en el sur de la Península Ibérica, se confirmó la infección del VLA serotipo 4 en cinco especies de rumiantes silvestres: ciervo rojo

(*Cervus elaphus*), corzo (*Capreolus capreolus*), muflón (*Ovis musimon*), gamo común (*Dama dama*), arruí (*Ammotragus lervia*) y cabra montesa (*Capra pyrenaica*) (Ruiz-Fons *et al.*, 2008). Otros estudios analizaron un brote de VLA serotipo 1 en el suroeste de España en una población silvestre de muflones con síntomas clínicos y mortalidad (Fernández-Pacheco *et al.*, 2008)

1.4 *Culicoides* spp. Vector Biológico de la Enfermedad de la Lengua Azul

Las principales especies involucradas en la transmisión de la enfermedad de la LA pertenecen al género *Culicoides*.

Los *Culicoides* son dípteros de pequeño tamaño (1 a 3 mm) de la familia Ceratopogonidae. Hasta la fecha se han identificado 1400 especies de *Culicoides* que pertenecen a 38 subgéneros distintos, siendo muchos de ellos considerados como insectos molestos debido a que sus picaduras producen dolor intenso y picor (Mellor *et al.*, 2000). En ciertas áreas, son los insectos que pican con más frecuencia al ganado y a los campesinos. La primera referencia a estos insectos fue dada por W. Dirham, quien describió sus costumbres y hábitos alimenticios en 1731 (Mellor *et al.*, 2000), y la primera campaña de investigación sub-sahariana de *Culicoides* data de 1908 cuando dos especies fueron descritas en Namibia (Enderlein, 1908).

- Posición taxonómica

Los *Culicoides* pertenecen a la Familia Ceratopogonidae, que incluye cuatro subfamilias de las cuales, únicamente la subfamilia Ceratopogoninae presenta importancia médico-veterinaria:

- Leptoconopinae
- Forcipomyiinae
- Dasyheleinae

- Ceratopogoninae; esta se divide en las tribus: Ceratopogonini, Culicoidini, Heteromyiini, Palpomyiini y Sphaeromyiini. Contiene 34 géneros y 36 subgéneros (McAlpine *et al.*, 1981). El género *Culicoides* pertenece a la tribu Culicoidini y es el principal género que participa en la transmisión de diversos tipos de enfermedades entre las que se encuentra la de la Lengua Azul.

- *Transmisor de patógenos*

Se han aislado más de 75 tipos de arbovirus de distintas especies de *Culicoides* (Meiswinkel *et al.*, 2004). Aparte del virus de la LA y el de la Peste Equina Africana pertenecientes a la familia Reoviridae, otros virus de importancia pertenecen a la familia Bunyaviridae, como los virus Akabane, Oropuche (patógeno humano más importante transmitido por ceratopogónidos) y el virus Schmallenberg de reciente aparición en rumiantes europeos (Gibbens, 2012). Otros virus incluyen a la familia Rhabdoviridae, como el virus de la Fiebre Efímera Bovina (Coetzer y Tustin, 2004), a la familia Nairoviridae, como el virus del Congo y a la familia Phleboviridae, como el virus de la Fiebre de Valle de Rift (Holbrook *et al.*, 1996).

También actúan como vectores biológicos de protozoos y nematodos en aves, humanos y otros animales (Braverman *et al.*, 1983; Linley, 1985; Mellor *et al.*, 2000; Meiswinkel *et al.*, 2004)

Además de la transmisión de patógenos, las picaduras de las hembras de *Culicoides* en caballos pueden ocasionar reacciones de hipersensibilidad frente a antígenos presentes en la saliva de los insectos provocando dermatitis alérgica equina (Riek, 1954).

- **Género Culicoides**

- **Morfología** (Fig. 2 y 3)

- Huevo: Son alargados y en *C. imicola* miden 400 µm de largo por 50 µm de ancho.

- Larva: Son vermiformes, y miden de 2 a 5 mm. En la cabeza presentan un prognato esclerotizado característico, con mandíbulas dentadas y manchas oculares.
- Pupa: Es cónica con un par de cornetes respiratorios dorsales que se insertan en el protórax. Las espinas, setas, protuberancias y procesos de las pupas pueden utilizarse como caracteres para la diferenciación taxonómica (Holbrook *et al.*, 1996)
- Imago:

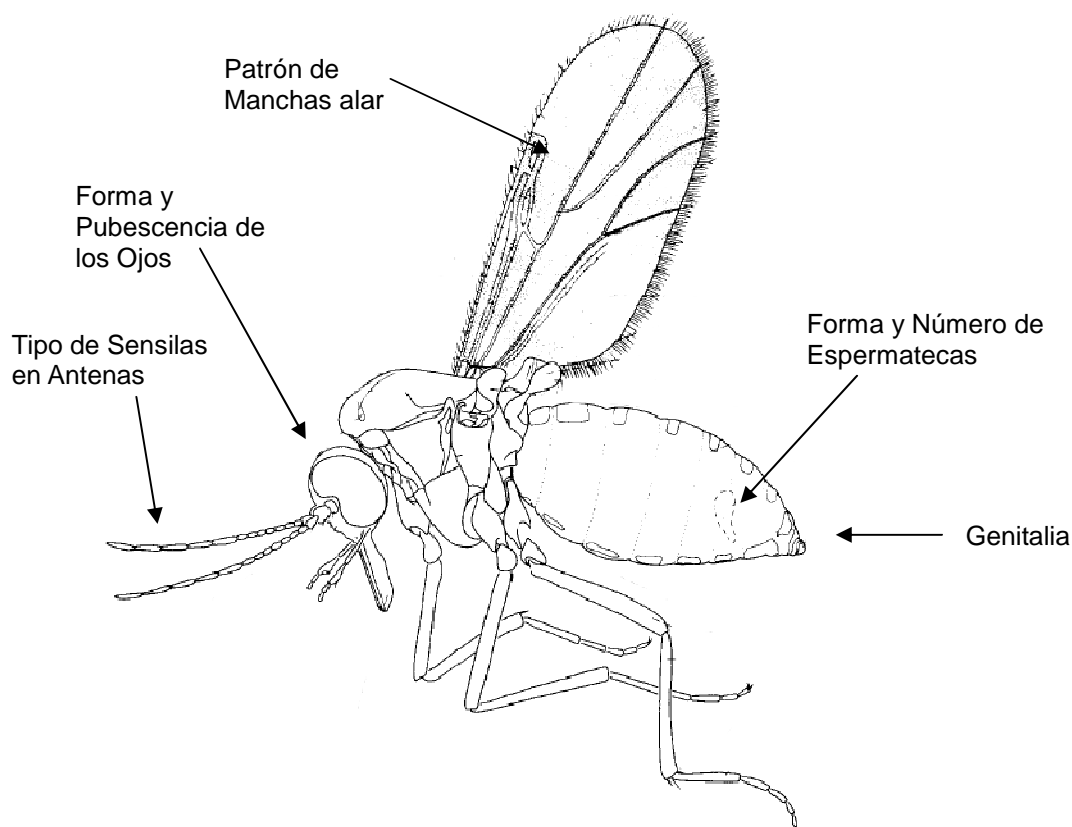


Figura 2. Esquema de una hembra adulta del género *Culicoides* mostrando los principales criterios de clasificación de especies (Adaptado de Arnaud, P.H., 1956).

* Cabeza:

- Ojos: Compuestos por facetas uniformes, generalmente desnudos (sin pilosidad). Ocupan más de la mitad de la cápsula cefálica.
- Antenas: Compuestas por 15 segmentos (13 artejos antenales más proescapo y escapo). Están recubiertas por sensilas en número, forma y disposición específicas que pueden utilizarse como caracteres de clasificación taxonómica y para determinar las preferencias del insecto por el hospedador sobre el que alimentarse (Jamnback, 1965; Braverman, Hulley, 1979; Ronderos, 1999). Presentan dimorfismo sexual, siendo las antenas de las hembras filiformes y las de los machos plumosas.



Figura 3. *Aspecto general de hembra de Culicoides imicola*
(Foto: David Borràs; IBABSA)

- Aparato bucal (Fig. 4): Tipo cortador-chupador. Las mandíbulas se presentan en forma de hojas afiladas y las maxilas en forma de largos estiletes. Ambas estructuras cortan y desgarran el tegumento de los mamíferos. Los machos no se alimentan de sangre y tienen las piezas bucales reducidas. Asociados a las piezas bucales, existen un par de **palpos maxilares** con cinco artejos. El tercer artejo es más grande y tiene un grupo especializado de sensilas localizadas en una depresión denominada **foseta sensorial**, que sirve como órgano sensitivo.

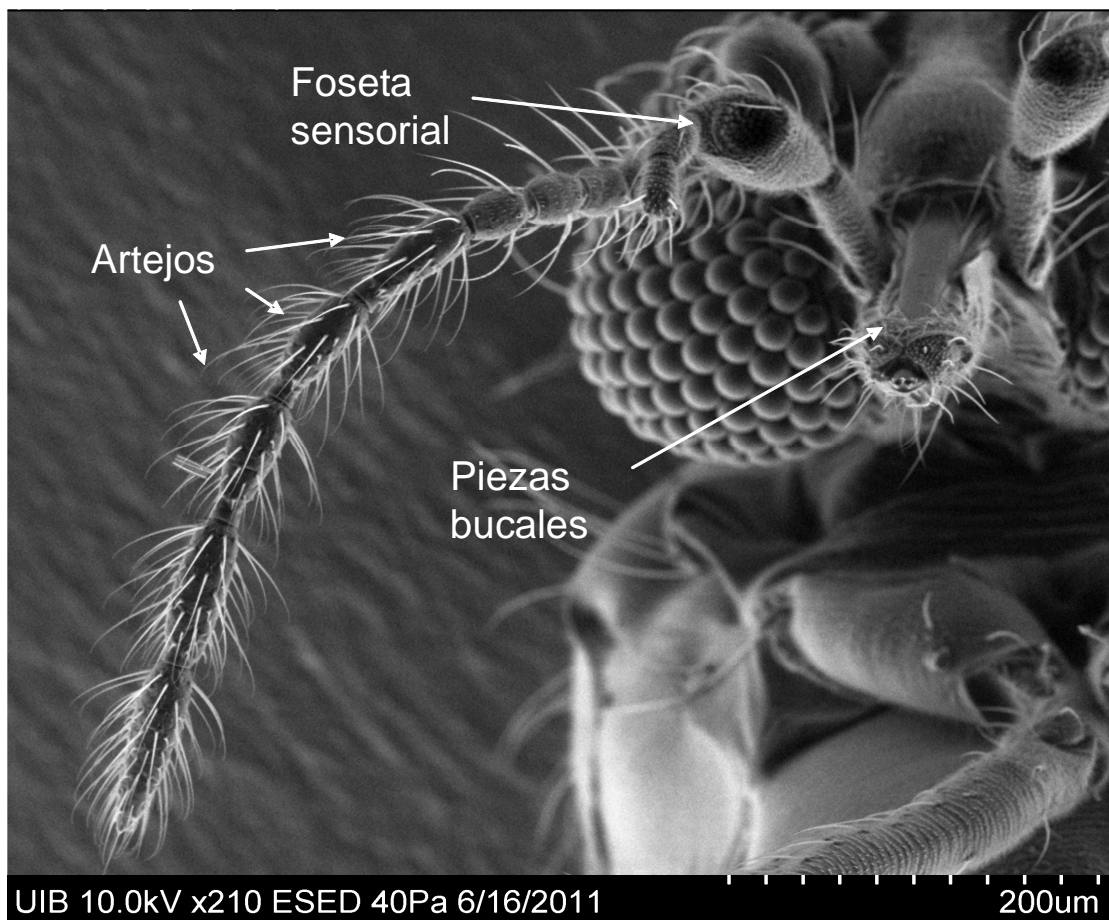


Figura 4. Visión frontal de la cabeza de *Culicoides* realizada mediante microscopio electrónico de barrido en donde se aprecian los artejos antenales con sus sensilas, ojos, palpos maxilares con fosetas sensoriales y piezas bucales (Foto: del Río, R.).

* Tórax:

- **Alas:** Permiten la diferenciación de la mayoría de especies de *Culicoides* (Fig. 5). Presentan una venación específica que las diferencia del resto de ceratopogónidos (Fig. 6) y están recubiertas por microtricos más o menos pigmentados que definen un patrón de manchas característico en gran parte de las especies de *Culicoides* (Boorman, 1988; Meiswinkel *et al.*, 2004).

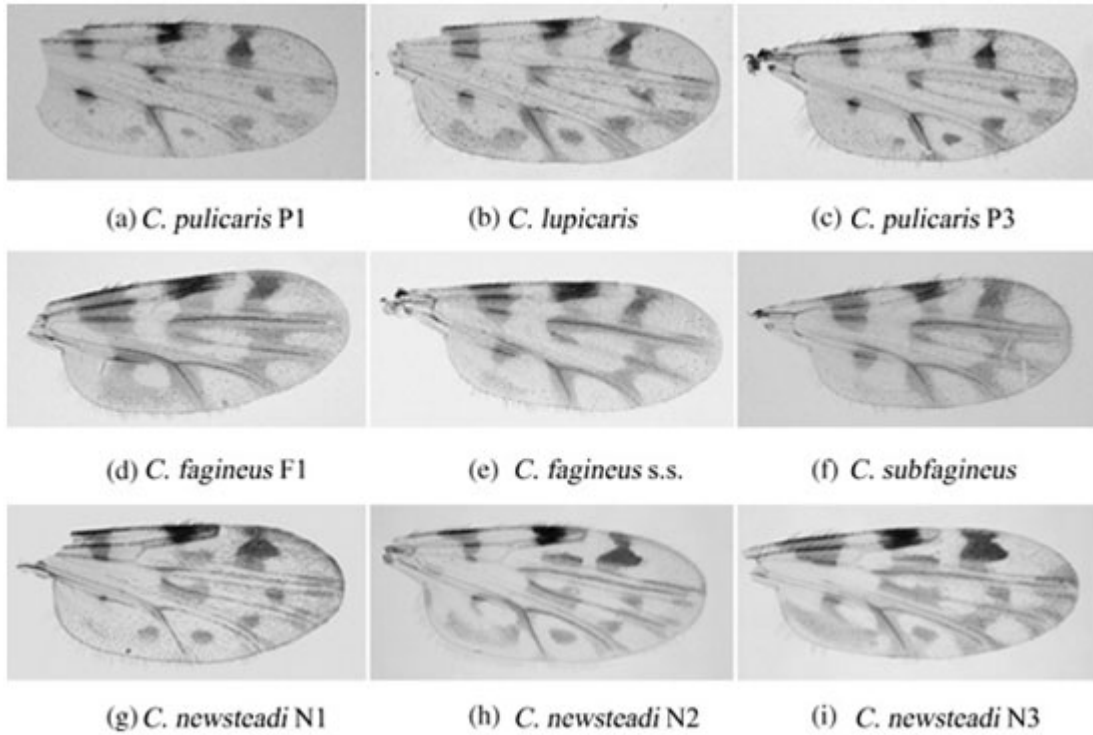


Figura 5. Alas de distintas especies de Culicoides en las que se puede apreciar las diferencias de los patrones de manchas (Fuente: CReSA)

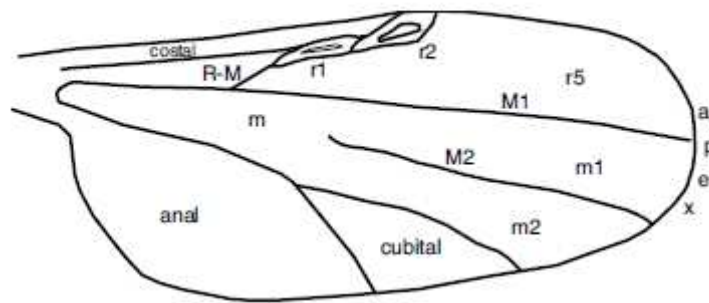


Figura 6. Venación alar del género Culicoides con la terminología utilizada en la determinación taxonómica (Adaptado de Rawlings, P., 1996)

- Patas: La tibia presenta peines tibiales útiles para la clasificación. Al final de cada tarso parte una uña tarsal curvada simple en hembras, pero dividida en los ápices en el macho. Presentan un empodio vestigial

* Abdomen: Formado por nueve segmentos. Las hembras poseen de una a tres espermatecas unidas a un conducto común. El número y forma de las espermatecas funcionales son importantes para la clasificación. En los machos, el abdomen es más estrecho y acaba en una genitalia prominente, que es importante para su clasificación. La pigmentación del abdomen permite discriminar los estados gonotróficos (Dyce, 1969).

- Alimentación

Los individuos adultos exhiben hábitos de alimentación crepusculares y nocturnos, aunque también existen especies diurnas (ej. *C. heliophilus*).

Ambos sexos se alimentan del néctar de las flores para obtener energía. Únicamente las hembras obtienen sangre (Meiswinkel *et al.*, 1994) para poder completar el desarrollo de los huevos.

- Vuelo

Las temperaturas en las que el vuelo tiene lugar se sitúan entre los 12 y los 35°C, y a esas temperaturas pueden encontrarse *Culicoides* volando hasta alturas de 1.7 Km (Walton y Osburn, 1992).

Pueden considerarse dos tipos de vuelo:

- 1- Activo: En ausencia de viento, o cuando este es de baja intensidad, los *Culicoides* pueden volar cortas distancias en cualquier dirección, tanto a favor como en contra del viento (Murray, 1987).

- 2- Pasivo: Debido a su pequeño tamaño, no se suelen encontrar *Culicoides* volando activamente cuando la velocidad del viento supera los 7 m/s. Cuando la fuerza del viento es mayor, los *Culicoides* pueden ser transportados por las corrientes de aire recorriendo distancias de hasta 700 Km (Sellers, 1991; Braverman y Chechik, 1996; Alba *et al.*, 2004), con el consiguiente riesgo de introducción del VLA.

- Distribución y Hábitats

Podemos encontrar especies del género *Culicoides* en prácticamente todas las grandes masas de tierra, con las únicas excepciones de la Antártida, Nueva Zelanda, Islandia y las islas Hawái (Mellor y Leake, 2000).

La mayoría de las especies de *Culicoides* vectores presentes en Europa se desarrollan en una variedad de hábitats particularmente húmedos. Se puede dividir el hábitat de las larvas en cuatro tipos generales (Coetzer *et al.*, 1994):

- Agua superficial e interfase agua-tierra (con enriquecimiento orgánico o no).
- Depositiones frescas de animales.
- Cavidades de árboles, plantas y grietas de rocas.
- Tallos de plantas en descomposición, frutos y hongos.

- Importancia como vector

Las especies de *Culicoides* que se consideran más importantes como vectores en la transmisión de Orbivirus a nivel mundial son los siguientes (Mellor, 2004; Tabachnick, 2004):

- *C. (Avaritia) imicola* Kieffer en África.
- *C. (Monoculicoides) sonorensis* Wirth y Jones en Norte América.
- *C. (Hoffmania) insignis* Lutz en el Sur y Centro América.
- *C. (Avaritia) wadai* Kitaoka; *C. (Avaritia) brevitarsis* Kieffer y *C. (Avaritia) actani* Smith en Australia.
- *C. (Avaritia) fulvus* Sen y Das Gupta y *C. (Remnia) schultzei* Enderlein en Asia.
- *C. imicola*; *C. (Culicoides) pulicaris* L., *C. (Avaritia) obsoletus* Meigen y *C. dewulfi* (Goetghebuer 1936) en Europa.

1.5 Ciclo biológico del vector

- *Ciclo de desarrollo* (Fig. 7):

Presentan un ciclo de vida holometábolo que dura aproximadamente de 2 a 6 semanas en función de la temperatura.

- Huevos: Son depositados en un patrón de doble fila sobre un sustrato húmedo. El número de huevos por puesta varía según la especie, y para *C. imicola* la media es de 69 huevos/puesta. El desarrollo del huevo dura de 2 (a 27°C) a 3-4 días (a 22°C) (Nevill, 1967; Beaty y Marquardt, 1996).
- Larva: Las larvas pasan por cuatro estadios (Holbrook *et al.*, 1996). La etapa larval dura de 12 a 16 días dependiendo de la temperatura.
- Pupa: La mayoría de las especies presentan una fase de pupa que es capaz de flotar si se produce una inundación del sustrato, excepto en el caso de *C. imicola* que no pupan hasta que las condiciones ambientales son lo suficientemente secas (Nevill, 1967).
- Imago: Los adultos emergen 2 o 3 días después del estado de pupa y un día más tarde ya ingieren sangre y realizan la cópula que tiene lugar en enjambres (Roeder *et al.*, 1991). En periodos fríos la vida del insecto se alarga considerablemente, pudiendo llegar a vivir hasta 63 días (Nevill, 1971), mientras que su actividad disminuye. Por el contrario, en periodos cálidos, su actividad es mayor y su vida se acorta. El intervalo óptimo de temperatura para la actividad de estos insectos se sitúa entre los 13° y los 35°C (Sellers, 1980).

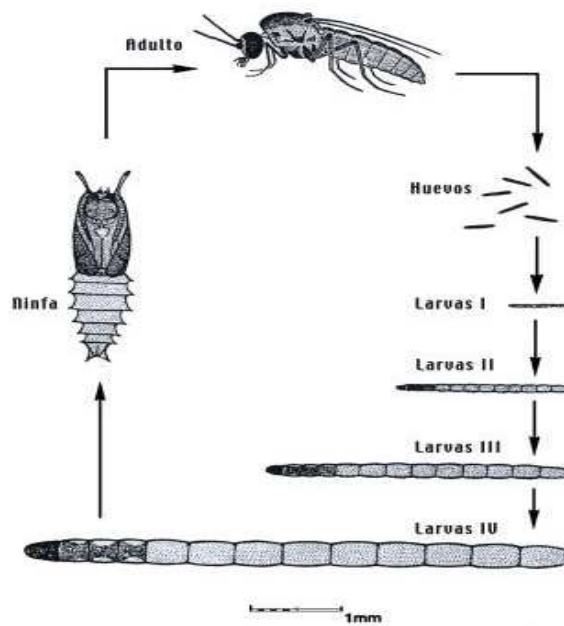


Figura 7. Ciclo biológico típico del género *Culicoides* (Modificado de J.C. Delécolle 1994)

- *Ciclo gonotrófico:*

Se denomina ciclo gonotrófico al ciclo de alimentación y la maduración de los huevos, seguido de la oviposición. Mayoritariamente se acepta que dichos estadios se pueden discriminar por la observación del abdomen (Dyce, 1969), si bien algunos autores han demostrado las limitaciones del método (Braverman y Mumcuoglu, 2009).

En las hembras de *Culicoides* se diferencian cuatro estadios gonotróficos (Fig. 8):

- Hembras Nulíparas: no se observa pigmentación abdominal. El abdomen del insecto es blanquecino-transparente indicando que es una hembra que aún no se ha alimentado de sangre.
- Hembras Alimentadas de Sangre: se observa el abdomen hinchado y rojizo debido a una ingesta de sangre reciente.
- Hembras Grávidas: se observan dos sacos repletos de huevos listos para la oviposición.

- Hembras Paras: el insecto ya ha depositado los huevos y se observa un abdomen con pigmentación rojiza debido a los restos de la sangre ingerida anteriormente.



Figura 8. Distintos estados gonotróficos de *C. obsoletus*. De izquierda a derecha: nulpára, para, grávida y alimentada de sangre (Foto: David Borràs, IBABSA).

En principio, las hembras paras son las únicas capaces de transmitir el virus, ya que han ingerido y digerido sangre potencialmente infectada, habiendo transcurrido el periodo de incubación extrínseco necesario para la replicación y diseminación del virus en el insecto. De hecho, los distintos tipos de Orbivirus se han aislado tan solo de hembras paras (Kramer *et al.*, 1990).

1.6 Principales especies de vectores implicados en la transmisión del VLA en España.

Hasta la fecha 32 especies de *Culicoides* se consideran implicadas en la transmisión de LA en el mundo (Meiswinkel *et al.*, 2004). En Europa, tanto las especies de vectores potenciales como aquéllas para las que se ha demostrado su papel transmisor, pertenecen a los subgéneros *Avaritia* y *Culicoides* (EFSA, 2008).

- Subgénero Avaritia:

+ *C. (Avaritia) imicola* (Kieffer) 1913:

Actualmente el complejo Imicola está constituido por 13 especies (Meiswinkel, 1995), a partir de las cuales se han aislado 23 tipos distintos de arbovirus (Coetzer y Tustin, 2004). El vector más importante de este complejo es *C. imicola*, siendo la única especie del complejo que se encuentra en Europa y que no presenta confusión en su identificación.

Es la especie de *Culicoides* más extendida, con una distribución Afroasiática. Hacia el Este se expande hasta Laos, Vietnam y el sur de China (Meiswinkel *et al.*, 2004). En España se detectó por primera vez en la provincia de Córdoba (Mellor *et al.*, 1983). En el año 2001 se detectó en Baleares y Cataluña (Miranda *et al.*, 2003; Sarto *et al.*, 2003).

C. imicola posee un amplio rango de hospedadores sobre los que se alimenta entre los que se pueden citar al ganado bovino y ovino, caballos, cerdos, cabras y aves de corral (Nevill y Anderson, 1972; Braverman y Rubina, 1976). En Israel se ha demostrado que completa once generaciones por año, con una duración aproximada de 23 días por generación, siendo el periodo entre una ingesta de sangre y la siguiente de 3.3 a 4.6 días (Braverman *et al.*, 1985; Braverman y Linley, 1988). Las zonas de puesta preferentes de *C. imicola* son suelos húmedos enriquecidos con materia orgánica donde las larvas se desarrollan (Braverman *et al.*, 1974). En diversos países de Europa se ha estudiado la prevalencia de *C. imicola* y se han realizado estudios de distribución geográfica de sus poblaciones (Baylis y Rawlings, 1998; Miranda *et al.*, 2004; Calvete *et al.*, 2006).

+ Complejo Obsoletus:

En la actualidad se considera que este complejo incluye las especies *C. (Avaritia) obsoletus* (Meigen 1818), *C. (Avaritia) scoticus* (Downes y Kettle 1952) y *C. (Avaritia) montanus* (Shakirzjanova 1962).

El término “Complejo” determina grupos de especies en los que las hembras presentan características morfológicas muy similares y es difícil diferenciar las distintas especies, por lo que se hace necesario recurrir a técnicas moleculares (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004;

Gomulski *et al.*, 2005; Nolan *et al.*, 2007). Los machos, en cambio, son fácilmente diferenciables morfológicamente.

El primer indicativo de que especies paleárticas de *Culicoides* podrían actuar como transmisoras de la enfermedad de la LA fue por el aislamiento de VLA-4 en Chipre en 1977 a partir de individuos del complejo *Obsoletus* (Mellor y Pitzolis, 1979). Posteriormente, se demostró que este vector permitía la replicación del virus a elevado título después de ser infectado oralmente en el laboratorio (Jennings y Mellor, 1988). En 2002 se aislaron en Italia los serotipos -2 y -9 de unos 100 individuos del complejo *Obsoletus* (Savini *et al.*, 2005).

Dentro del complejo *Obsoletus*, *C. obsoletus* y *C. scoticus* se encuentran distribuidos ampliamente dentro de la zona paleártica, en cambio *C. montanus* es menos común y se encuentra principalmente en Cerdeña, Sicilia y Sur de Italia. Los lugares de cría de *C. obsoletus* incluye una gran variedad de hábitats, desde hojarasca, agua estancada y zonas pantanosas (Dzhafarov, 1964; Dzhafarov *et al.*, 1976; Conte *et al.*, 2007), hasta deposiciones de caballo y compuesto orgánico (Campbell y Pelham-Clinton, 1960). Se ha estimado que la temperatura óptima para *C. obsoletus* se sitúa entre los 11 y los 27.5°C (Dzhafarov, 1964).

1.7 Detección de especies vectoras potenciales

Aunque una gran cantidad de artrópodos son capaces de transmitir un determinado agente etiológico, solo aquellos que son importantes para mantener el ciclo biológico natural del patógeno son considerados como vectores primarios. Para determinar vectores primarios se utilizan cuatro criterios principales (WHO, 1967):

1. El vector debe estar en contacto y alimentarse del hospedador vertebrado en condiciones naturales. Además, la estacionalidad y localización de la actividad del artrópodo coincide con la incidencia de la infección en el vertebrado.
2. En el campo se deben poder capturar periódicamente vectores infectados de manera natural

3. El presunto vector debe poder ser infectado cuando se alimente de un hospedador virémico.
4. La habilidad de un vector infectado para transmitir el patógeno a un nuevo hospedador vertebrado debe ser confirmado en condiciones controladas.

Las especies que cumplen estos cuatro criterios son consideradas como “vectores probados”, mientras que las especies que solo cumplen algunos de los criterios se consideran como “posibles vectores”. Las demás especies, asociadas con el hospedador vertebrado, son consideradas como “vectores potenciales”.

- *Capacidad vectorial*

La capacidad vectorial es la habilidad de una especie vectora para transmitir un patógeno en una región y época del año determinados. Incluye las interacciones del vector con el patógeno y con el hospedador vertebrado, así como las características innatas del vector como el tamaño de la población del vector, su longevidad, la duración y número de ciclos gonotróficos, el comportamiento alimenticio, la duración de la viremia, el horario de actividad y la competencia vectorial (Reisen, 1989; Dye, 1992).

- *Competencia vectorial*

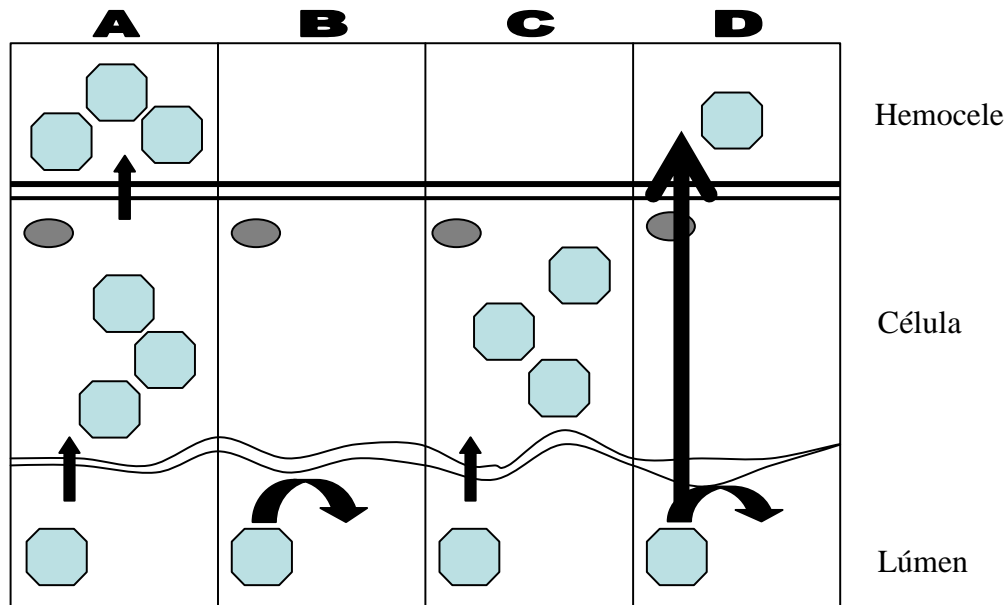
Es la habilidad intrínseca de un vector para transmitir un agente biológicamente. En nuestro caso, la competencia vectorial es una medida del número de *Culicoides* que se infectan después de alimentarse sobre un animal virémico y depende de la constitución genética del vector y de las influencias ambientales externas (Tabachnick, 1991; Mellor *et al.*, 1998; Wittmann, 2000). La competencia vectorial incluye: la susceptibilidad a la infección, la permisividad para la replicación del patógeno, la duración del periodo de incubación extrínseco y la eficiencia de transmisión del agente infeccioso. Por ello, la competencia vectorial está restringida a la interacción vector-patógeno (Beatty y Marquardt, 1996).

- Determinación experimental de la competencia vectorial

La competencia vectorial de las especies de *Culicoides* se valora experimentalmente permitiendo la alimentación de los insectos sobre animales virémicos o sobre suspensiones víricas. Los *Culicoides* alimentados se mantienen vivos para permitir al virus replicarse y diseminarse en el interior del insecto (Periodo de Incubación Extrínseco) en un periodo de diez días. La habilidad de los *Culicoides* infectados para transmitir el virus se puede determinar permitiendo que estos se alimenten sobre animales susceptibles o sobre sustitutos alternativos como huevos embrionados de pollo (Jones, 1961; Boorman, 1974). Alternativamente se pueden utilizar homogenados del insecto infectado para inocular cultivos celulares sensibles al virus y determinar su efecto citopático (Venter *et al.*, 1998).

- Barreras a la transmisión biológica de arbovirus

En cualquier sistema vector-arbovirus se presentan una serie de barreras a la infección. La siguiente figura (Fig. 9) muestra las distintas posibilidades que pueden tener lugar cuando un arbovirus es ingerido por el vector:



A: Permisivo B: Barrera a la Infección C: Barrera a la Diseminación D: Permeable

Figura 9. Esquema de la pared celular del insecto mostrando las posibles barreras a la infección por orbivirus. En **A** el VLA pasa del lumen a la célula donde se multiplica y después sale de ella para diseminarse en el hemocele del insecto. En **B** el VLA no es capaz de infectar la célula. En **C** el VLA infecta la célula pero queda retenido en ella y no se disemina. En **D** el VLA pasa directamente al hemocele del insecto sin infección celular previa (Adaptado de Beaty y Marquardt, 1996).

La presencia o ausencia de estas barreras determina parcialmente la competencia vectorial del artrópodo. Han sido demostradas o hipotetizadas varias barreras a la infección en el vector: en el intestino medio, las glándulas salivares y a nivel de los ovarios. Dichas barreras pueden variar si se produce un cambio en factores externos, como en el caso de *Culicoides nubeculosus*, especie común en Europa que se considera incapaz de transmitir el VLA debido a la Barrera a la Infección del Intestino Medio (BIIM). Sin embargo, cuando las larvas de esta especie se crían a distintas temperaturas, el virus se replica a un alto título en los adultos infectados (Wittmann, 2000).

1.8 Importancia económica e impactos

La Lengua Azul es una enfermedad de declaración obligatoria. La mayor parte de las razas ovinas, sobre todo en regiones donde el virus es endémico, son resistentes a la enfermedad (Spreull, 1905; Hardy y Price, 1952). Los brotes típicos de la enfermedad

ocurren cuando ovejas susceptibles son introducidas en zonas endémicas, o cuando los vectores infectados llevan el virus de regiones endémicas a zonas con ovejas susceptibles.

Las infecciones producidas por el VLA pueden ser costosas por varios motivos, entre los que destacan los costes asociados a síntomas clínicos en los animales, los asociados al sacrificio de los animales infectados (en España supusieron un coste cercano a los 500.000 euros en 2010 (RASVE, 2010)), los costes de vigilancia (3.5 millones de euros en 2010 (RASVE, 2010)), la vacunación (\approx 100 millones de euros en 2008 en España) y la pérdida de comercio debido a las barreras interpuestas para los movimientos internacionales de animales y sus productos (incluyendo semen y embriones) (Holbrook *et al.*, 1996). El coste estimado del brote de VLA8 en Francia en 2007 fue de un billón de euros y en Holanda de 60 millones de euros.

1.9 Incursiones de la enfermedad

La enfermedad de la LA había aparecido en Europa antes de 1995, pero sin llegar a establecerse de manera endémica (Mellor y Boorman, 1995). Sin embargo, a partir de 1998, el VLA se expandió en toda la cuenca Mediterránea y el norte de Europa (Purse *et al.*, 2005).

- Incursión de la enfermedad mediante el transporte pasivo de vectores o virus:

Existen tres escenarios que contemplan la introducción de vectores o virus de forma pasiva en una zona geográfica libre de la enfermedad, estos son: las corrientes de aire, el transporte de animales y sus derivados, y el transporte de insectos potencialmente infectados asociados a medios de transporte.

- Corrientes de aire: Las incursiones estacionales del virus en latitudes más templadas se han relacionado con el transporte por el viento a largas distancias de vectores adultos infectados (Sellers, 1991; Braverman y Chechik, 1996). En el caso concreto del serotipo -2, detectado en Baleares en el año 2000, se determinó, mediante estudios de retro-trayectorias de corrientes de aire, que *Culicoides*

infectados podían haber llegado al archipiélago desde las islas de Córcega y Cerdeña (Alba *et al.*, 2004).

- Asociados a animales y material biológico: incluye el transporte de animales domésticos o salvajes que sean susceptibles a la enfermedad o que puedan actuar como reservorios (Alexander *et al.*, 1994; Alexander *et al.*, 1996; Jauniaux *et al.*, 2008), así como el transporte de material biológico como vacunas contaminadas (Wilbur *et al.*, 1994), o por el comercio de productos (suero, semen, óvulos y embriones) de animales infectados (Sellers, 1980).
- Asociados a medios de transporte: puede darse el caso de que *Culicoides* infectados puedan ser transportados pasivamente a grandes distancias a través de continentes y océanos mediante los medios de transporte, tal como ocurrió en China (Nie *et al.*, 2005). Las probabilidades de introducción del VLA en una región mediante esta vía son variables a lo largo del año debido a las diferencias en la temperatura ambiente, pero generalmente son muy bajas (Napp *et al.*, 2009).

1.10 Distribución de la enfermedad en Europa

En el Mediterráneo, la enfermedad fue detectada por primera vez en 1943 en Chipre, siendo también el primer caso confirmado de la enfermedad fuera de África (Gambles, 1949). Hasta 1995, el virus se encontraba generalmente dentro de la franja geográfica comprendida entre la latitud 40°N y 35°S. Sin embargo, entre 1998 y 2005 al menos cinco serotipos (VLA-1, -2, -4, -9 y -16) se detectaron de manera constante en la cuenca mediterránea (Calvete *et al.*, 2006; Barros *et al.*, 2007), y desde agosto del 2006, VLA-8 ha estado presente en el norte de Europa (Fig. 10) (Thiry *et al.*, 2006).

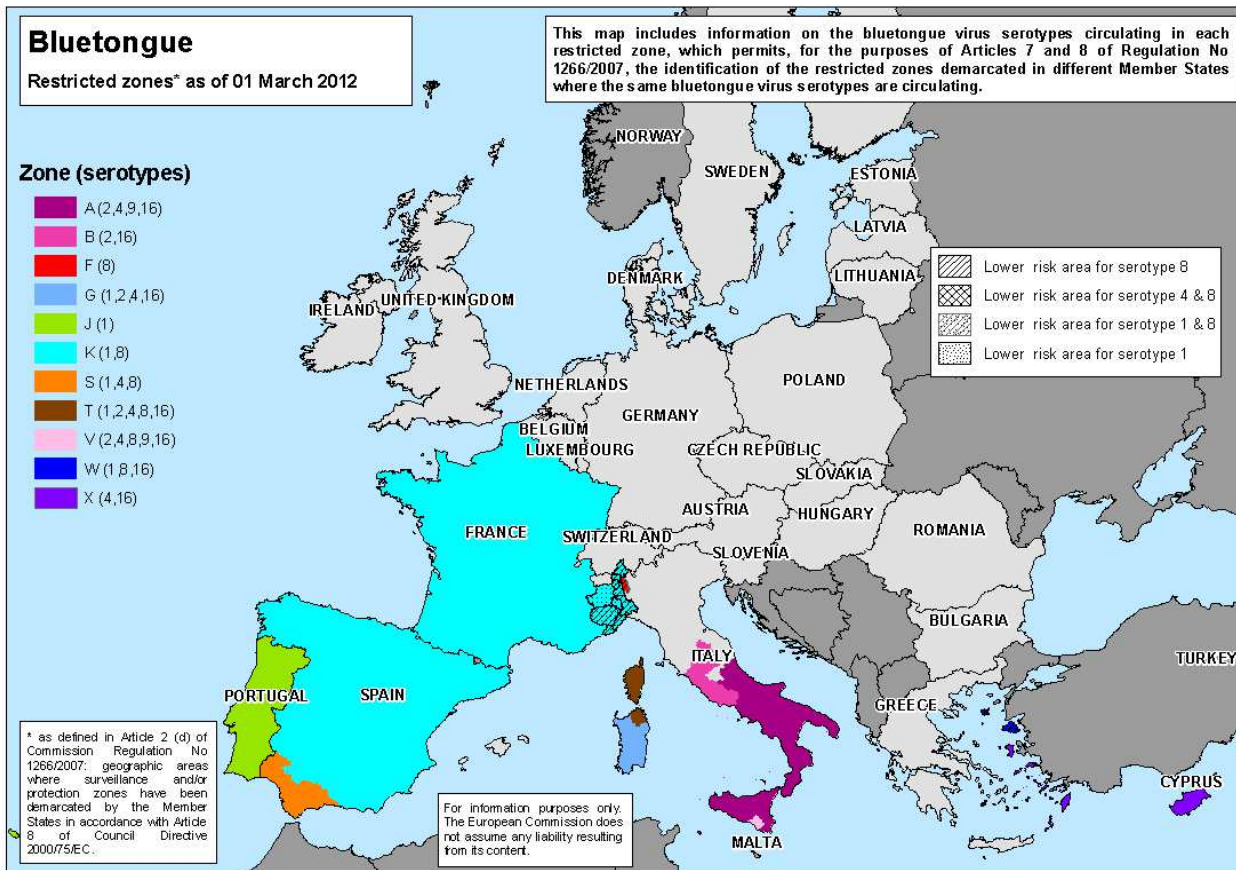


Figura 10. Mapa de zonas de restricción al movimiento de animales debido al virus de la Lengua Azul en Europa (actualizado el 16 de marzo del 2012), en donde se representa los distintos serotipos del virus circulando en los diferentes países y regiones. (Fuente: EFSA)

En la actualidad numerosos investigadores sostienen que el cambio climático puede ser la razón más influyente de la transmisión y expansión de la LA (Wittman *et al.*, 2001; Purse *et al.*, 2005).

- Brotes de Lengua Azul en España

Los primeros registros se sitúan entre los años 1956 y 1960, cuando el serotipo-10 entró en Portugal y el suroeste peninsular desde el norte de África, presumiblemente mediante vectores transportados por el viento. Este brote fue responsable de la pérdida de 100.000 ovejas (Campano López y Sánchez Botija, 1958; Manso Ribeiro y Noronha, 1958). En septiembre de 2000, el VLA2 apareció en Mallorca y Menorca causando 305 brotes (Gómez-Tejedor, 2004) y en octubre de 2003 se detectó en Menorca. En octubre del 2004

VLA-4 se registró en la Península Ibérica. En 2007 se detectó el serotipo 1 en Cádiz y se extendió por el sur y centro de la Península, así como en el País Vasco y Navarra (RASVE, 2011). El serotipo 8 se aisló en nuestro país en enero de 2008 en Cantabria (Schwartz-Cornil *et al.*, 2008). En octubre de 2008 se notificó en Andalucía y en noviembre en Lugo (Galicia). En 2009, únicamente se declaró un foco del serotipo 8 y 375 focos del serotipo 1. Durante 2010 se notificaron 79 focos del serotipo 1, 8 focos del serotipo 4 y 1 foco del serotipo 8. Durante 2011 se notificaron tan solo 8 brotes del serotipo 1 y 2 brotes del serotipo 4. En 2012 se han notificado hasta el mes de mayo dos brotes del serotipo 1 y tres brotes del serotipo 4 (<http://rasve.mapa.es>)



Figura 11. Mapa en el que se muestran las zonas de restricción al traslado de animales sensibles a la LA utilizado para elaborar los planes de vacunación contra los distintos serotipos en la Península Ibérica (Fuente: RASVE 2012)

1.11 Curso de la enfermedad

Se ha comprobado que existen diferentes respuestas celulares ante la infección del virus de la LA en bovino y en ovino. Estas diferencias son posiblemente la base por la cual los efectos de la infección del virus en ganado ovino sean más drásticas que las sufridas por los bóvidos infectados (DeMaula *et al.*, 2001; DeMaula *et al.*, 2002a; DeMaula *et al.*, 2002b).

Los signos clínicos comunes en ovejas incluyen edema (de labios, morro, cara, mandíbula, párpados y a veces oídos), congestión, apatía generalizada, inflamación, laminitis y lengua cianótica (OIE, 1998).

1.12 Diagnóstico

Se realiza un diagnóstico presuntivo a partir de signos clínicos y lesiones. Posteriormente, se confirma en el laboratorio (Afshar, 1994; Clavijo *et al.*, 2000; Conraths *et al.*, 2007). En la actualidad y de forma muy resumida, las técnicas de diagnóstico disponibles para el VLA son las siguientes:

- Detección del VLA en vertebrados

Directa: i) Aislamiento del virus en embrión de pollo; ii) Aislamiento en cultivos celulares de sangre (no coagulada) o en muestras de tejido; iii) Inoculación vírica en ovejas.

Indirecta: i) Detección de Anticuerpos; ii) Técnicas de ELISA; iii) Ensayos de Neutralización Sérica (NS).

- Detección molecular

- *RT-PCR en tiempo real*

Las técnicas más utilizadas hoy en día son los aislamientos en cultivos celulares, técnicas de ELISA, NS y RT-PCRs.

1.13 Control de la enfermedad

El ciclo del VLA puede ser interrumpido por la inmunización de los hospedadores vertebrados (sobre todo el vacuno), por la eliminación de vectores o por la prevención del ataque del vector.

- CONTROL DE VECTORES

Dos estrategias entran en juego a la hora de intentar limitar la población activa del vector: las que implican métodos culturales y las que implican métodos químicos.

- **Métodos Culturales:**

*Reducción de los lugares de cría: Las prácticas agrícolas y ganaderas generan condiciones idóneas para el desarrollo de las larvas de *Culicoides* mediante la creación de zonas húmedas (goteos, tuberías, zonas de acumulación de purines, etc.). Una buena gestión de estas prácticas podría reducir el número de zonas de cría (Mellor y Woolhouse, 2002).

*Protección del ganado mediante establos: Se trata de estabular a los animales durante los periodos de máxima actividad de los *Culicoides* en instalaciones cerradas. Su efectividad depende del grado de aislamiento del establo y de las preferencias de los *Culicoides* de alimentarse fuera (exofilia) o dentro (endofilia) de los establos (Baylis *et al.*, 2010).

- **Métodos Químicos y Biológicos:**

Se basan en el tratamiento con insecticidas, tanto a animales, lugares de cría, establos y vehículos de transporte de ganado. Hasta el momento no existe ningún producto específico autorizado por la U.E. para el control de las distintas especies de *Culicoides*.

Los tipos de tratamientos químicos para el control de *Culicoides* pueden dividirse en:

- Adulticidas: Durante la epidemia de Lengua Azul del Mediterráneo, países como Grecia, Bulgaria, España e Italia utilizaron la fumigación ambiental para reducir la transmisión de la enfermedad. Sin embargo, tan sólo hay publicado un estudio de campo (Satta *et al.*, 2004), en el que se observó una eficacia nula del insecticida.

* *Mallas tratadas con insecticidas*

Debido al tamaño de los *Culicoides* (1-3 mm), las mallas utilizadas para otros insectos no son útiles. Mallas con diámetro de poro de 1.6 mm² reducen la entrada de *Culicoides* en tan sólo un 56%, e incluso mallas con diámetros de poro más pequeños (0.9 mm²) aún dejan pasar un 5% de estos insectos (Porter, 1959). Por otro lado, se ha evaluado la eficacia en laboratorio de mallas tratadas con organofosforados sobre *C. mississippiensis* y *C. furens* obteniéndose mortalidades > 90% durante los primeros 30 min. post-contacto con ciertos compuestos como el Proporux, (Dukes y Axtell, 1976; Kline y Roberts, 1981). Hasta la fecha no se han ensayado mallas tratadas con piretroides para el control de *Culicoides*. En el presente trabajo se presentan los primeros resultados de la eficacia insecticida de mallas tratadas con deltametrina sobre poblaciones de *Culicoides* en condiciones de laboratorio y de campo.

* *Ganado tratado con insecticida*

Los insecticidas y repelentes utilizados en los últimos años están basados en piretrinas potenciadas con butóxido de piperonilo. Pueden dividirse en formulaciones de aplicación tópica (formulaciones *pour-on*), crotales, de inmersión y sistémicas inyectables (EFSA, 2008).

En general, los estudios se han centrado en las formulaciones *pour-on* (aplicadas en el lomo del animal). Se ha demostrado que la aplicación de permetrina y otros piretroides (deltametrina, cipermetrina, pirimifos metil) en cabras, bóvidos y ovinos reduce la alimentación de *Culicoides* spp. (Nielsen *et al.*, 1988; Mullens, 1993; Mullens *et al.*, 2000; Carpenter *et al.*, 2007). Otras materias activas, como las ivermectinas aplicadas mediante

inyección subcutánea, provocaron una mortalidad >99% en una colonia de laboratorio de *C. brevitarsis* (Standfast *et al.*, 1984). Sin embargo, estudios realizados en EE.UU. mostraron una baja eficacia usando colonias de *C. sonorensis* (Holbrook y Mullens, 1994).

- Larvicidas: Si bien hace 40 años en EE.UU. se controlaron especies que habitan en zonas salobres (Clements y Rogers, 1968), la utilización de estos productos hoy en día sería inviable debido a su elevada toxicidad ambiental.

Patógenos:

Bacillus thuringiensis: Los ensayos de laboratorio con la var. *israeliensis* fueron poco eficaces contra larvas silvestres de *C. mississippiensis* y *C. guttipennis* y contra larvas de laboratorio de *C. sonorensis* y *C. occidentalis* (Kelson *et al.*, 1980).

Mermítidos: Son nematodos patógenos, principalmente del género *Heleidomermis* (Hribar y Murphree, 1987; Poinar y Mullens, 1987; Paine y Mullens, 1994). Poinar y Sarto describieron en 2006 la especie *Heleidomermis cataloniensis* (Poinar y Sarto i Monteys, 2008). Sin embargo, no se ha comprobado su efectividad en estudios de campo.

Reguladores del crecimiento: Se ha utilizado dimilín y metopreno en estudios de laboratorio observando que reducían la emergencia de adultos de *C. sonorensis* en un 90% (Apperson, Yows, 1976) y los de *C. circumscriptus* en un 100% (Takahashi *et al.*, 1985).

Hongos: El patógeno *Lagenidium giganteum* se ha aislado de *Culicoides molestus* en Australia con ratios de infección en larvas entre el 1 y 33% (Wright y Easton, 1996). Especies del género *Nosema* se han aislado de especies de *Culicoides* de ambientes salobres (Kline *et al.*, 1985), y

especies del género *Vavraria* en *Culicoides edeni* (Atkinson, 1990). Su aplicación práctica es todavía inviable.

- Repelentes: No se han realizado estudios específicos sobre el efecto de la aplicación de repelentes en ganado. Algunos compuestos (ej.: PMD, DEET y Picardín) han demostrado la reducción de picaduras en humanos (Trigg, 1996; Carpenter *et al.*, 2005).
- Atrayentes: En Escocia con la trampa Mosquito Magnet[®] y una corriente cálida de CO₂ (0.5 l/min) y 1-octen-3-ol (6–8 mg/h) asociada a extractos obtenidos a partir del pelo de animales, se capturó significativamente un mayor número de *Culicoides* con ciertos extractos (ej. Búfalo) (Mands *et al.*, 2004). Sin embargo, por el momento, no se han obtenido resultados concluyentes de la eficacia de los productos semioquímicos ensayados hasta la fecha.

- VACUNACIÓN

La inmunización profiláctica del ganado ovino es la medida de control más práctica y eficaz, especialmente cuando la amenaza de una epidemia es debida tan sólo a un serotipo. Sin embargo, la presencia de múltiples serotipos del virus requiere vacunas multivalentes, muchas veces no disponibles. Actualmente existen dos tipos de vacunas, las vacunas con virus atenuados y las vacunas inactivadas.

1.14 Programa de erradicación y vigilancia de la lengua azul

Desde la aparición de la enfermedad de la LA en el año 2000 en Mallorca y Menorca, se estableció por parte del Ministerio de Medio Ambiente Rural y Marino y la “Conselleria de Agricultura i Pesca de les Illes Balears” un programa de vigilancia de LA a nivel autonómico, en el que se incluía un programa de vigilancia entomológica y serológica. El brote ocurrido en el 2003 en Baleares motivó la elaboración de un programa a nivel

nacional que continúa hasta la actualidad. Este incluye dos subprogramas básicos: uno de vigilancia serológica y otro de vigilancia entomológica.

- *Programa de vigilancia serológica*

Se basa en la utilización de animales “centinela”, a los que periódicamente se les extrae muestras de sangre para la detección del virus mediante técnicas de PCR, o mediante detección de anticuerpos. Los bóvidos son utilizados preferentemente debido a que es la especie más sensible a la infección.

- *Programa de vigilancia entomológica*

Se basa en la colocación de trampas de luz U.V. diseñadas para la captura de *Culicoides* spp. con el objetivo de monitorizar su abundancia y distribución. En España se encuentran instaladas 75 trampas que componen la Red de Estaciones de Vigilancia Entomológica Permanente (REVEP). De ellas, 47 están ubicadas en zonas de alto riesgo y trabajan durante todo el año, mientras que las 28 restantes lo hacen únicamente durante los “periodos estacionalmente libres del vector” (generalmente establecido desde el 15 de octubre hasta el 15 de mayo del año siguiente).

Gracias a los mencionados programas, en las Islas Baleares se conoce que existen poblaciones bien establecidas de *C. imicola* y del complejo *Obsoletus* (Miranda *et al.*, 2003). En Mallorca, el complejo *Obsoletus* predomina en los meses de junio y julio, mientras que en septiembre y octubre lo es *C. imicola* (Miranda *et al.*, 2004).

1.15 Hibernación del virus y de los vectores. Implicaciones epidemiológicas

El VLA se transmite durante todo el año en regiones tropicales. En zonas templadas, las infecciones tienen lugar a finales de verano y principio de otoño, y el mismo serotipo puede reaparecer al año siguiente, sugiriendo que es capaz de persistir aunque no se detecte su actividad (Osmani *et al.*, 2006). Este fenómeno de “hibernación” ha sido observado desde hace años (Nevill, 1971) y se han sugerido varias explicaciones basadas en la persistencia del virus en el hospedador vertebrado o en el vector. En general, durante el invierno se produce un descenso de las poblaciones de vectores en Europa, que

determina un periodo en el que la probabilidad de transmisión es muy baja o nula. De este modo, se define un “periodo de bajo riesgo de transmisión” en el que el movimiento de animales entre territorios puede llevarse a cabo con ciertas garantías. La determinación, por tanto, de dicho periodo es uno de los aspectos más relevantes en la actualidad (EFSA, 2008). En la mayoría de los países de Europa se basa en las capturas de adultos mediante trampas de luz. Sin embargo, no existe una estandarización de dichas capturas e incluso, en muchas ocasiones, los tipos de trampas utilizados son diferentes en cada país. En consecuencia, se desconoce qué trampa es la más eficaz a la hora de atraer y atrapar *Culicoides*, su especificidad, ni su sensibilidad en bajas poblaciones del vector.

2. *Objetivos del Estudio*

Los principales objetivos de este estudio fueron:

- Comparar los distintos tipos de trampas utilizadas para el muestro entomológico de *Culicoides* y determinar su eficacia relativa.
- Determinar qué trampa es la más adecuada para calcular el periodo estacional de ausencia de *Culicoides* asociado a un riesgo bajo de transmisión del virus.
- Estudiar la susceptibilidad oral de poblaciones sudafricanas de *Culicoides imicola*, con serotipos del VLA que han circulado en España.
- Analizar mediante bioensayos en cámaras de la OMS, la sensibilidad de distintas especies locales de *Culicoides* a la deltametrina como insecticida de aplicación tópica
- Estudiar mediante bioensayos en cámaras de la OMS y ensayos de campo, la sensibilidad de poblaciones locales de *Culicoides* a mallas impregnadas con deltametrina.

3. Comparación de sistemas de
seguimiento y captura de especies de
Culicoides spp. vectoras del Virus de
la Lengua Azul asociadas a
explotaciones ganaderas de las Islas
Baleares*

* Este apartado se ha enviado a publicar. Se puede encontrar la copia en inglés en el
Anexo 9.2

3.1 INTRODUCCIÓN

En el presente ensayo se ha llevado a cabo un estudio de campo con distintas trampas de luz que son o han sido utilizadas para la captura y monitorización de las poblaciones de *Culicoides* en diferentes países.

Los principales objetivos de este estudio fueron:

- 1.-Establecer un sistema de comparación entre distintas trampas de luz de manera que los datos de capturas obtenidos con ellas puedan estandarizarse.
- 2.-Determinar la sensibilidad de cada una de las trampas en periodos de baja densidad poblacional de las especies de *Culicoides*.
- 3.-Determinar los porcentajes de abundancia relativa de cada una de las especies de *Culicoides* capturadas en cada tipo de trampa y en distintos periodos del año.
- 4.-Analizar el estado gonotrófico de cada una de las especies capturadas para determinar el inicio del periodo de riesgo de transmisión.
- 5.-Relacionar los resultados obtenidos en base al concepto de periodo de bajo riesgo de transmisión tal como aparece en la legislación de la UE.

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

- Localización:

El presente estudio se llevó a cabo en la explotación agraria de Son Bernat (39° 42'N 3° 01'E) situada en el término municipal de Llubí (Mallorca). La finca se dedica principalmente a la producción láctea y para ello dispone de aproximadamente unas 50 cabezas de ganado bovino que son ordeñadas dos veces al día. Las reses se mantienen estabuladas en un recinto de 25 m² siguiendo un sistema clásico de ganadería intensiva y se las alimenta con grano y paja. En el recinto donde se mantienen encerrados los animales se acumula orín y heces, que se mezclan con la paja, creando así un ambiente idóneo para la cría de *Culicoides*.

- Tipos de trampas:

Las cuatro trampas utilizadas para el estudio fueron (Fig. 12):

- Trampa Onderstepoort:

Desarrollada por el Instituto Veterinario de Onderstepoort (Sudáfrica) y manufacturada desde entonces por el Instituto de Ingeniería Agrícola de ese país (ARC-Institute for Agricultural Engineering). Esta trampa está equipada con un tubo de luz U.V. azulada de 30 cm y 8 W. Se conecta directamente a la red eléctrica ya que posee transformador propio. Es una trampa robusta y pesada (4 kg). La succión de los insectos se realiza a través de un ventilador con una capacidad media de desplazamiento de aire de 204.5 ± 9.47 m³/min. (Venter y Meiswinkel, 1994; Goffredo y Meiswinkel, 2004). Las capturas son recogidas en un bote de 500 ml. La recogida de insectos de gran tamaño se evita por una malla de poliéster de 2 mm de paso colocada alrededor de la fuente de luz. Este tipo de trampa se ha utilizado desde 1970 como herramienta en la monitorización y captura de *Culicoides* para aislamientos víricos en Sudáfrica (Meiswinkel *et al.*, 2004) y, desde 1996, se ha introducido en varios países de Europa como Italia (Goffredo y Meiswinkel, 2004), Grecia (Patakakis, 2004), Suiza (Cagienard *et al.*, 2006) y Francia (Baldet *et al.*, 2008; Balenghien, 2008).

- Trampa mini-CDC (modelo 1212):

Trampa manufacturada y distribuida por la Compañía John Hock (Gainesville, FL, EE.UU.). Está compuesta por un tubo de luz U.V. azulada de 15 cm y 4 W de potencia. Se puede activar mediante corriente o batería. Si se acciona a la corriente debe disponer de un transformador de 6 V, en el caso que la trampa posea célula fotosensible de activación/parada, o de 12 V, si carece de ella. Está fabricada en plástico y su peso es de 0.8 Kg. La succión de los insectos se realiza a través de un ventilador con una capacidad media de desplazamiento de aire de 11.06 m³/min (Chandler y Highton, 1975). Los insectos aspirados a través del ventilador son recogidos en un bote colector de 450 ml. La entrada de polillas e insectos de gran tamaño se evita mediante una rejilla metálica de diámetro de paso de 5 mm colocada entre la fuente de luz y el aspirador de la trampa. Se utiliza en España (Miranda *et al.*, 2004), Portugal (Capela *et al.*, 1993), Bélgica (De Deken *et al.*, 2008) y EE.UU. (Smith y Mullens, 2003).

- Trampa Rieb:

J.P. Rieb diseñó esta trampa en 1979 (Rieb, 1982). Se compone de un tubo de luz U.V. blanca de 15 cm de longitud y 4 W de potencia. Posee incorporado un transformador de 12 V a través de cual se conecta a corriente eléctrica. Está fabricada en plástico y tiene un peso aproximado de 1 Kg. Las polillas e insectos de mayor tamaño son excluidos de la trampa mediante una rejilla de diámetro de paso de 5 mm colocada alrededor de la fuente de luz. El bote colector de insectos posee una capacidad de 40 ml. Se utilizó entre 2000 y 2005 para la monitorización de *Culicoides* en Francia (Baldet *et al.*, 2008) y en 2006 fue sustituida por la trampa Onderstepoort.

- Trampa Pirbright:

Diseñada por John Boorman en el Instituto de Sanidad Animal de Pirbright (IAH, Reino Unido). Es una trampa de 2.4 Kg de peso provista de una bombilla incandescente de 4 W. Se conecta a la corriente eléctrica mediante un transformador propio. Las polillas e insectos grandes son excluidos de la trampa por una rejilla de metal de 5 mm de diámetro

de paso colocada alrededor de la fuente de luz. La capacidad del bote colector de insectos es de 90 ml. Se utilizó para la monitorización de *Culicoides* en el Reino Unido y en España durante la epizootia de Peste Equina Africana en la década de los 90 (Rawlings y Mellor, 1994). También fue utilizada inicialmente en Grecia (Patakakis, 2004) y en el norte y este de África (Baylis *et al.*, 1997; Rawlings *et al.*, 1998). Esta trampa ya no está disponible comercialmente y se reemplazó por la Onderstepoort en 1996.



Onderstepoort

Mini-CDC

Rieb

Pirbright

Figura 12. Fotos de las cuatro trampas utilizadas en el estudio. (Fotos:Dr. Gert Venter, Instituto Veterinario de Onderstepoort)

- Método de Comparación:

Las trampas se dispusieron siguiendo un diseño de bloque aleatorio de manera que todas ellas estuvieran en cada uno de los sitios seleccionados el mismo número de veces durante el periodo de ensayo (Snedecor y Cochran, 1980). Con este tipo de rotación se consigue que la media de las capturas obtenidas en cada una de las trampas sea independiente de cualquier efecto determinado por el sitio o por la posible interferencia entre trampas (Perry *et al.*, 1980; Wall y Perry, 1980). Las trampas se pusieron en funcionamiento desde el atardecer hasta el amanecer, cerca de los animales estabulados, a una altura que variaba entre los 1.5 y los 2 m, y separadas entre ellas unos 20 m (Fig. 13). La comparación se llevó a cabo durante un número determinado de noches, no necesariamente consecutivas.

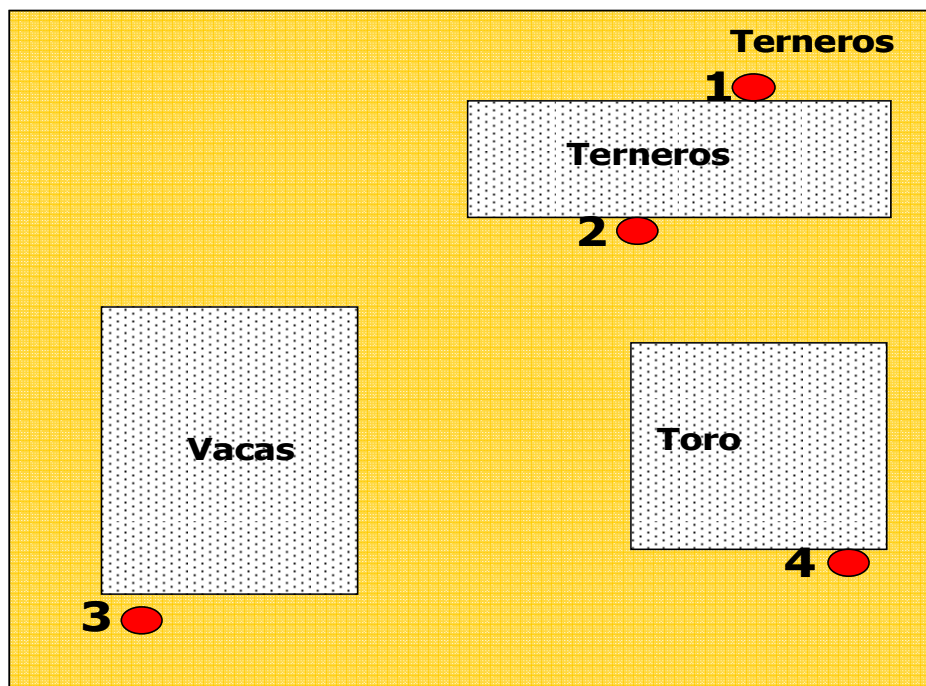


Figura 13. Esquema de la distribución de las trampas y los animales en la finca agrícola. Con los puntos rojos se designan las posiciones de las trampas junto con el número de referencia. Las cajas indican las instalaciones en donde se mantenían a los animales.

En la ubicación de las trampas se tuvo en cuenta que las distintas trampas estuviesen lo suficientemente separadas entre ellas para evitar cualquier tipo de interferencia y que estuviesen lo suficientemente cerca entre ellas como para que los cambios meteorológicos les afectasen por igual.

- Ensayos:

En total se realizaron tres ensayos:

- El primero tuvo lugar a mediados de otoño (18 de octubre-19 de noviembre 2007) y se llevaron a cabo nueve muestreos. El estudio se inició con las trampas Onderstepoort, Rieb y mini-CDC. La trampa Pirbright se incorporó más tarde (08-11-07) debido a problemas de suministro y la trampa Rieb se eliminó del estudio el 26-10-07 debido a sus repetidos fallos de funcionamiento.

- El segundo ensayo se realizó a finales de invierno y principios de primavera (18 de febrero-4 de junio 2008). Se llevaron a cabo 20 muestreos y no se incorporó la trampa Rieb.
- El tercer y último ensayo tuvo lugar en otoño del 2008 (1 de octubre-20 de noviembre), con un total de 17 noches muestreadas y de nuevo solo 3 trampas (Onderstepoort, mini-CDC y Pirbright) fueron incluidas en el ensayo.

- Tratamiento de las capturas:

Los *Culicoides* capturados se identificaron y separaron por especies según su patrón alar con ayuda de una lupa binocular. Posteriormente se separaron por sexo y, en el caso de las hembras, se clasificaron también según su estado gonotrófico siguiendo el método descrito por Dyce en: Nulíparas, Paras, Grávidas y Alimentadas de Sangre (Dyce, 1969).

La identificación del complejo *Obsoletus* se basó, al igual que para otras especies, en la morfología del patrón alar, por lo que dentro de este grupo se incluyen las especies *C. (Avaritia) obsoletus* (Meigen 1818), *C. (Avaritia) scoticus* (Downes y Kettle 1952) y *C. (Avaritia) montanus* (Shakirzjanova 1962).

Una vez separados, los *Culicoides* se mantuvieron en etanol al 70%.

- Tratamiento de datos:

Los datos se expresaron como nº *Culicoides* /trampa y noche. Para los análisis de la varianza (ANOVA) se utilizó el test de la menor diferencia significativa de Fisher (Fisher's Least Significant Difference; LSD test) utilizando intervalos de confianza del 95% y el test U de Mann-Whitney con el programa StatGraphics Plus.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 1^{er} Ensayo: (18 de octubre-19 de noviembre 2007)

Durante esta prueba se capturó un total de 679 ejemplares de *Culicoides*, identificándose cinco especies (*C. newsteadi* (Austen 1921), *C. imicola* (Kieffer 1913), *C. circumscriptus* (Kieffer 1918), Complejo Obsoletus (Meigen 1918), *C. univittatus* (Vimmer 1932)). Debido a las condiciones meteorológicas adversas durante este periodo, sólo se pudieron ensayar las trampas durante 10 noches. El fallo de la trampa mini-CDC durante la primera noche de muestreo y la incorporación tardía de la trampa Pirbright debido a problemas de suministro impidió que las distintas trampas se ensayaran durante el mismo número de noches. Para la comparación de trampas se tuvo en cuenta, por tanto, la media de capturas por noche.

La trampa Onderstepoort capturó el mayor número de *Culicoides* ($\bar{\chi}=43$ *Culicoides*/noche) comparado con las otras tres trampas, mientras que la trampa Rieb obtuvo el menor número de capturas ($\bar{\chi}= 3.3$ C/n) (Fig. 14). Se encontraron diferencias significativas (dif. > 0.7; $P < 0.05$) entre las capturas de la trampa Rieb y las otras tres trampas, pero no entre las capturas de la trampa Onderstepoort y las trampas mini-CDC y Pirbright.

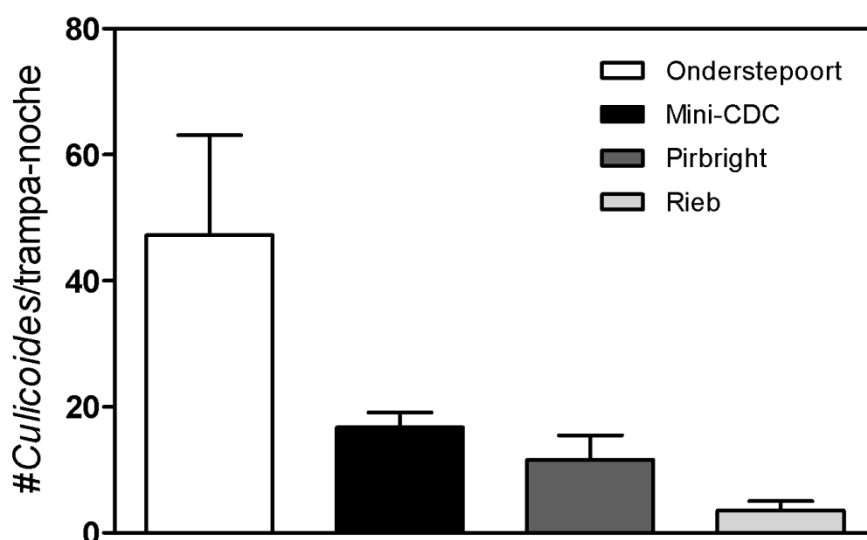


Figura 14. Media de capturas de *Culicoides* junto con su error estándar en las diferentes trampas durante el 1er ensayo (18-10 al 19-11 de 2007).

En la Figura 15 se muestran las capturas por separado de cada trampa por noche de muestreo. Durante seis noches (del total de diez noches muestreadas) la trampa Onderstepoort capturó un número mayor de *Culicoides* comparado con las otras tres trampas. Así mismo, puede apreciarse que las capturas de la trampa francesa (Rieb) se situaron durante todo el periodo de muestreo en valores inferiores al resto de las trampas ensayadas (≈ 5 *Culicoides*/trampa).

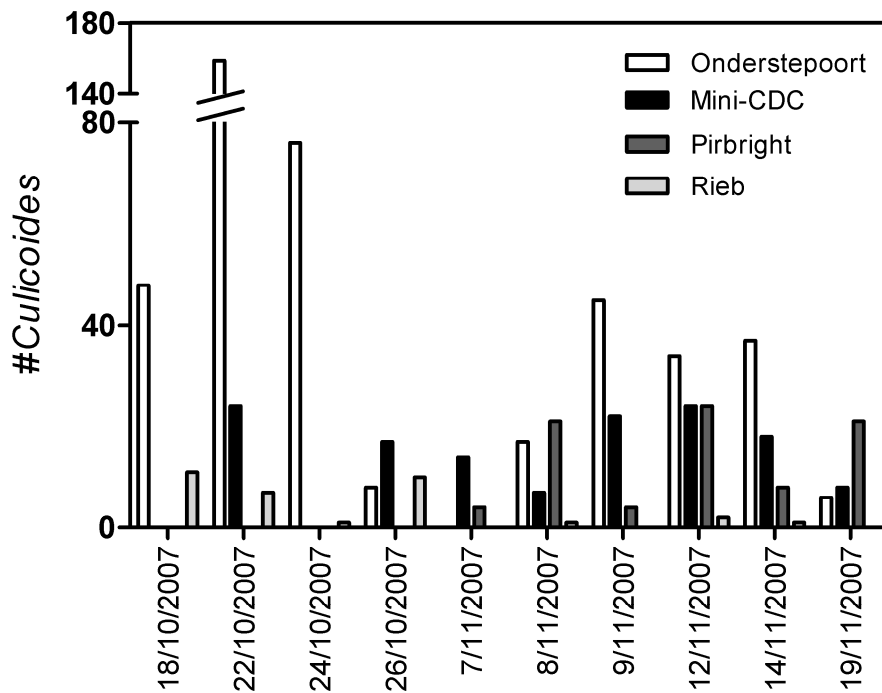


Figura 15. Número de *Culicoides* por trampa y noche para cada una de las trampas ensayadas en el periodo del 18-10-07 al 19-11-07 (1^{er} ensayo). El 8/11/2007 se incluyó la trampa inglesa (Pirbright) en el ensayo.

De las cinco especies de *Culicoides* capturadas, solo tres *C. newsteadi*, complejo *Obsoletus* y *C. univittatus* se capturaron en todas las trampas.

Las trampas Onderstepoort y Pirbright capturaron las cinco especies, mientras que las trampas mini-CDC y Rieb no capturaron *C. circumscriptus*. Ningún ejemplar de *C. imicola* fue capturado por la trampa Rieb. Esta última especie representó únicamente el 1.2% del total de capturas (Tabla 1).

C. newsteadi fue la especie más abundante en las cuatro trampas (59.6% del total de capturas), resultando desde el 49.6% en la trampa mini-CDC hasta el 86.2% en la trampa Rieb (Tabla 1). No se observaron diferencias significativas entre la media de capturas de esta especie en las trampas Onderstepoort, mini-CDC y Pirbright. Sin embargo, si que se encontraron entre la media de capturas de las trampas Rieb y Onderstepoort (dif.= 0.3; $P < 0.05$).

La segunda especie más abundante en el total de capturas fue *C. imicola* (21.2% del total de capturas), colectado principalmente por las trampas Onderstepoort (22.5% del total de capturas de esta trampa) y mini-CDC (29.3% del total de capturas de esta trampa) (Tabla 1). Se encontraron diferencias significativas en la media de capturas obtenidas de *C. imicola* en relación con las otras especies de *Culicoides* entre las trampas Onderstepoort y mini-CDC con respecto a las otras dos trampas (dif. > 1; $P < 0.05$).

Tabla 1. Número de muestreos por trampa (N), número total de capturas y media de capturas por noches ($\bar{\chi}$) junto con su error estándar (S.E.). Porcentaje de las especies de *Culicoides* capturados en las trampas durante el 1er ensayo (18/10 al 19/11 de 2007) y en comparación con las otras tres trampas.

	Onderstepoort		Mini-CDC		Pirbright		Rieb		Total
N	10		9		6		10		
Capturas	430 (63,3%)		134 (19,7%)		82 (12,1%)		33 (4,9%)		679
$\bar{\chi} \pm S.E.$	43 \pm 15,6		14,88 \pm 2,8		13,6 \pm 3,1		3,3 \pm 1,44		
Especies	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)
<i>C. newsteadi</i>	60,2	66,5	49,6	17,3	64,9	9,7	86,2	6,5	59,6
<i>C. imicola</i>	22,5	69,9	29,3	28,7	3,5	1,5	0	0	21,2
<i>C. univittatus</i>	7,3	49,2	16,5	34,9	14	12,7	6,9	3,2	9,8
Compl. Obsoletus	8,5	69,2	4,5	11,5	14	15,4	6,9	3,8	8,1
<i>C. circumscriptus</i>	1,4	75	0	0	3,5	25	0	0	1,2

* Porcentaje de capturas en relación a las capturas totales de la especie en las cuatro trampas

Las especies del complejo Obsoletus, segundo vector de importancia en Europa, supusieron el 8.1% del total de especies capturadas durante este periodo del ensayo y fue obtenido principalmente por la trampa Onderstepoort (69.2% del total de capturas de esta especie) (Tabla 1).

Aunque este ensayo ofreció tan solo resultados preliminares en la comparación de trampas, sirvió para establecer una base para futuros estudios sobre la captura de *Culicoides* con distintos tipos de trampas tal y como se presenta a continuación.

3.3.2 2º Ensayo: (18 de febrero-5 de junio 2008)

Durante el periodo que duró esta prueba se realizaron un total de 21 muestreos. Debido a los repetidos fallos de la trampa francesa (Rieb), se decidió retirarla de nuevo del ensayo y continuar la prueba con tan solo tres trampas (Onderstepoort, mini-CDC y Pirbright). Al eliminar una de las trampas de ensayo, el resto de las trampas se rotaron en sentido anti-horario cada noche de muestreo en tres de las cuatro posiciones seleccionadas inicialmente.

Durante este ensayo se establecieron dos periodos de captura que se designaron de acuerdo con la abundancia de *Culicoides* en el campo. El primer periodo (18 de febrero-14 de marzo 2008) fue útil para la determinación de la sensibilidad de cada una de las trampas en la captura de *Culicoides* en condiciones de baja densidad poblacional, mientras que el segundo periodo (16 de abril - 5 de junio 2008) nos sirvió para obtener datos más sólidos en el estudio de comparación iniciado el año anterior cuando las poblaciones de *Culicoides* eran más elevadas.

- Primer periodo: (18 de febrero-14 de marzo 2008)

Esta primera parte del ensayo tuvo lugar en condiciones de baja densidad poblacional de *Culicoides*, cuando las temperaturas invernales disminuyen el número de vectores activos. El índice de capturas durante este primer periodo no superó, normalmente, los 20 *Culicoides*/trampa-noche, excepto en dos noches. Se realizaron un total de ocho muestreos efectivos capturando un total de 375 *Culicoides* pertenecientes a ocho especies distintas (complejo *Obsoletus*, *C. univittatus*, *C. newsteadi*, *C. circumscriptus*, *C. imicola*, *C. impunctatus* (Goetghebuer 1920), *C. punctatus* (Meigen 1804) y *C. jumineri* (Callot & Kremer 1969)). Como se ha comentado, debido a sus continuos fallos de funcionamiento, la trampa Rieb se retiró del estudio en el quinto muestreo.

En la Figura 16 se muestra la media de las capturas totales de *Culicoides* durante el primer periodo de muestreo. Aunque la trampa Onderstepoort tuviera una media de capturas totales (31.2 C/n) mayor que las otras trampas (mini-CDC 7.9 C/n, Pirbright 7.8 C/n) no se observaron diferencias significativas de capturas entre las distintas trampas (dif.< 0.5; $P < 0.05$). Debido a las condiciones climáticas variables en las distintas noches de muestreo y a la distinta densidad de población de *Culicoides* en cada uno de los lugares seleccionados para la ubicación de las trampa, el número de insectos capturados en las distintas noches de muestreo es muy diverso, de ahí que se obtuvieran desviaciones estándar elevadas para cada una de las tres trampas.

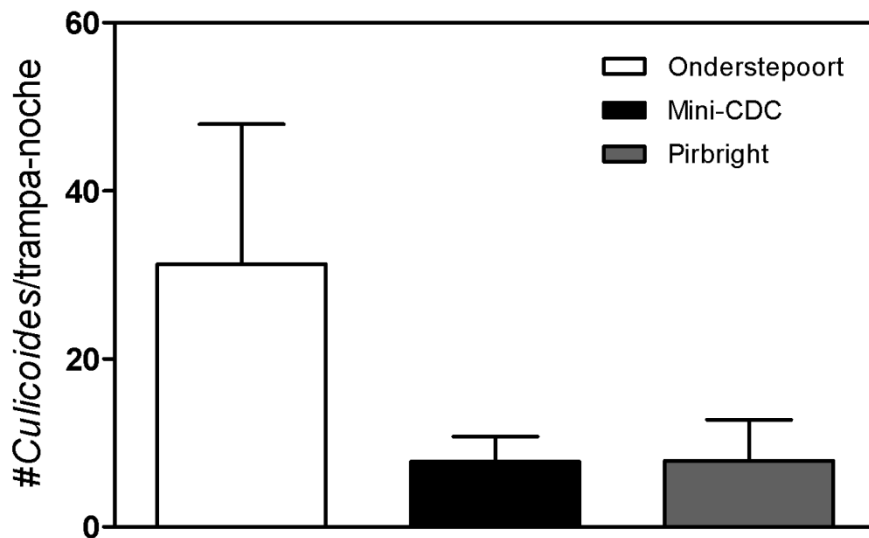


Figura 16. Media de capturas totales de *Culicoides* junto con su error estándar en las diferentes trampas durante el primer periodo del 2° ensayo (18/02 al 14/04 de 2008).

En la Figura 17 se muestran las capturas obtenidas por cada trampa por noche de muestreo. Las capturas durante este periodo no alcanzaron los 20 *Culicoides*/trampa noche excepto en dos noches (18 febrero y 3 marzo) cuando las capturas fueron anormalmente elevadas. De las ocho noches muestreadas durante esta temporada, en cinco de ellas la trampa Onderstepoort capturó un mayor número de *Culicoides*. La trampa mini-CDC obtuvo mayores capturas en dos de las noches de muestreo y en una de las noches la trampa Pirbright capturó un mayor número de *Culicoides* que las otras dos (Fig. 17).

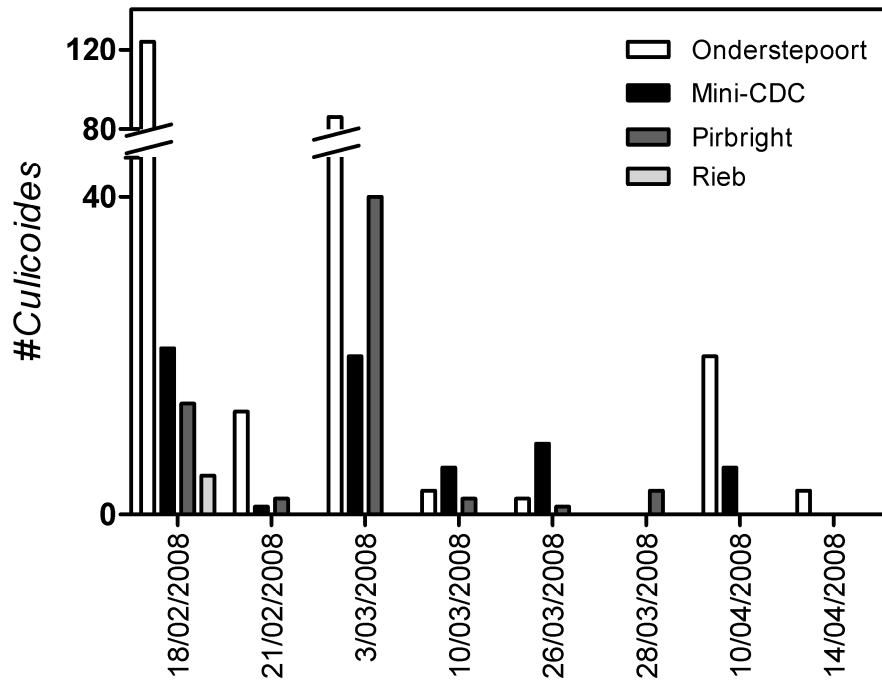


Figura 17. Número total de Culicoides por trampa noche para cada una de las trampas durante el 1er periodo del 2º ensayo (18/02 al 14/04 de 2008).

En la Tabla 2 se muestra el número total de capturas y las medias obtenidas para cada trampa y su composición específica. Las especies más capturadas en todas las trampas fueron aquellas incluidas dentro del complejo *Obsoletus* (59% del total de capturas). Las siguientes especies en abundancia capturadas fueron *C. univittatus* (16.9%) y *C. newsteadi* (14.4%). El porcentaje de *C. circumscriptus* fue del 6.9% en todas las trampas ensayadas. La especie *C. imicola* se capturó únicamente en las trampas Onderstepoort y Pirbright y constituyó el 1% de las capturas totales. Tres especies (*C. impunctatus* (Goetghebuer 1920), *C. punctatus* (Meigen 1804) y *C. jumineri* (Callot & Kremer 1969)) que representaron menos del 1% de las capturas totales se colectaron únicamente con la trampa Onderstepoort (Tabla 2).

Tabla 2. Número de muestreos por trampa (*N*), número total de capturas y media de capturas por noches junto con su error estándar ($\bar{X} \pm S.E.$). Porcentaje de las especies de *Culicoides* capturados en las trampas durante el 1er periodo (18/02 al 14/04 de 2008) del 2º ensayo y en comparación con las otras tres trampas

	Onderstepoort		Mini-CDC		Pirbright		Total
<i>N</i>	8		8		8		
Capturas	250 (66,6%)		63 (16,8%)		62 (16,5%)		375
$\bar{X} \pm S.E.$	31,2 \pm 16,7		7,9 \pm 2,9		7,8 \pm 4,9		
Especies	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)
Compl. Obsoletus	61,1	67,0	69,8	19,1	42,7	13,9	59,0
<i>C. univittatus</i>	18,7	71,2	7,9	7,6	18,7	21,2	16,9
<i>C. newsteadi</i>	12,7	57,1	17,5	19,6	17,3	23,2	14,4
<i>C. circumscriptus</i>	4,4	40,7	4,8	11,1	17,3	48,2	6,9
<i>C. imicola</i>	0,4	25,0	0	0	4,0	75,0	1,0
<i>C. impunctatus</i>	0,8	100	0	0	0	0	0,5
<i>C. punctatus</i>	0,8	100	0	0	0	0	0,5
<i>C. jumineri</i>	1,2	100	0	0	0	0	0,8

* Porcentaje de capturas en relación a las capturas totales de la especie en las cuatro trampas

No se observaron diferencias significativas en las capturas del complejo Obsoletus en relación con las otras especies capturadas por las diferentes trampas (dif.< 0.2; $P < 0.05$).

- Segundo periodo: (16 de abril - 5 de junio 2008)

Durante este segundo periodo del ensayo tan solo se compararon tres de las trampas iniciales (la trampa Rieb se descartó definitivamente del ensayo). Se muestreó durante 13 noches capturando un total de 4564 *Culicoides* pertenecientes a siete especies distintas (Complejo Obsoletus, *C. newsteadi*, *C. univittatus*, *C. jumineri*, *C. circumscriptus*, *C. imicola* y *C. impunctatus*).

A diferencia de los resultados obtenidos anteriormente, la trampa mini-CDC fue la que capturó un mayor número de *Culicoides* ($\bar{X} = 193.4$ C/n; 49.5% del total). Las trampas Onderstepoort y Pirbright capturaron una media de 98.9 C/n (30.3%) y 78.9 C/n (17.5%) *Culicoides* respectivamente (Fig. 18). No se observaron diferencias significativas en las capturas entre las tres trampas.

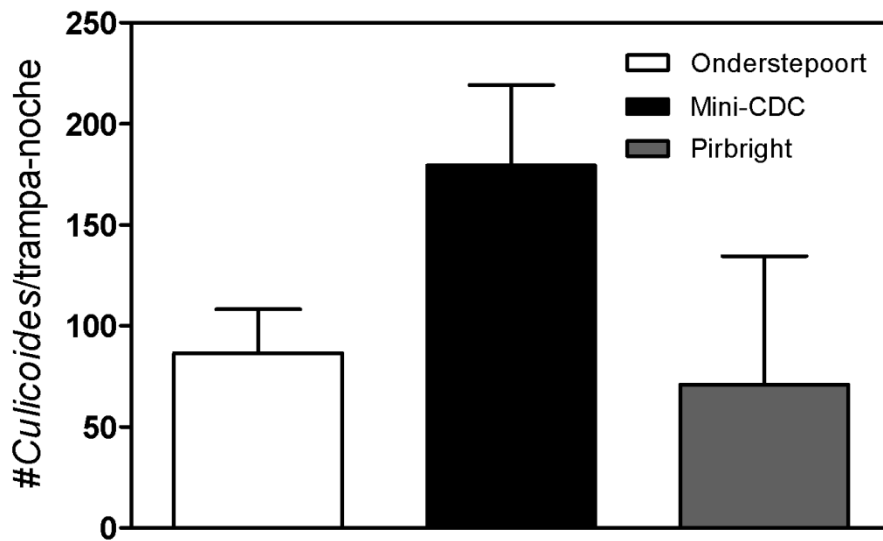


Figura 18. Media de la captura de *Culicoides* junto con su error estándar en las diferentes trampas durante el 2º periodo del 2º ensayo (16/04 al 5/06 de 2008).

En la Figura 19 se puede observar que la trampa mini-CDC obtuvo una mayor eficacia en la captura de *Culicoides* en 5 de las 13 noches muestreadas. La trampa Pirbright, al igual que la trampa Onderstepoort, superaron en capturas a las otras dos trampas en 4 de las noches de muestreo.

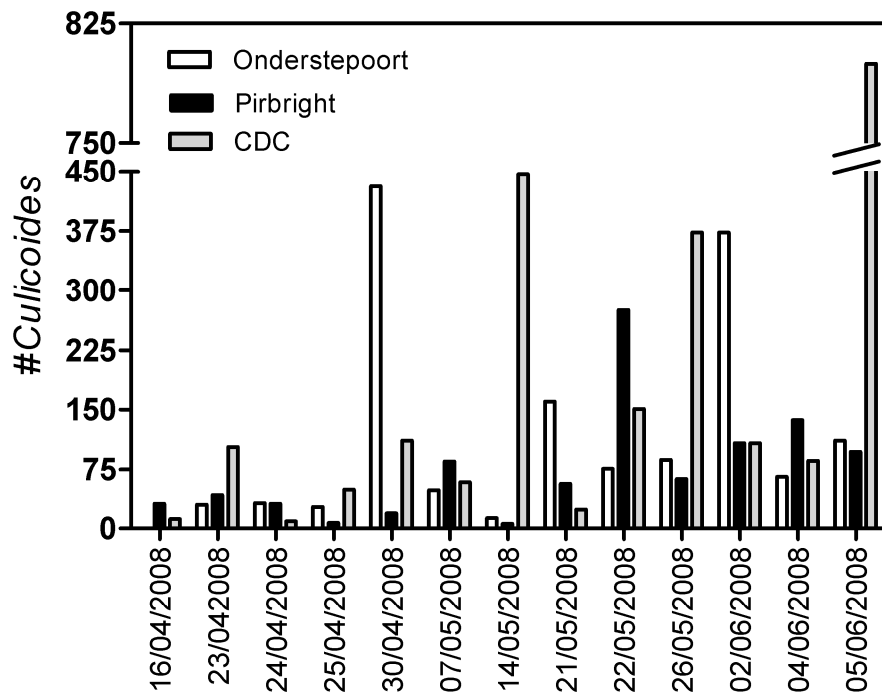


Figura 19. Número total de *Culicoides* por trampa noche para cada una de las trampas durante el 2° periodo del 2° ensayo (16/04 al 05/06 de 2008).

Las especies dominantes durante este periodo fueron las que se incluyen dentro del complejo *Obsoletus* (72.6%). Este grupo supuso las tres cuartas partes del total de capturas de *Culicoides* en las trampas Onderstepoort y mini-CDC y más de la mitad en la trampa Pirbright (Tabla 3). No se observaron diferencias en relación a las capturas del complejo *Obsoletus* y las otras especies entre las tres trampas (dif.< 0.08; $P < 0.05$). El porcentaje de capturas de *C. newsteadi* no fue tan elevado como en ensayos anteriores y se situó en torno al 17% en las tres trampas. Las capturas de *C. imicola* fueron extremadamente bajas durante estos meses (0.1%). La trampa Pirbright no capturó ningún ejemplar de *C. imicola*. Sin embargo, esta trampa tuvo un mayor porcentaje en capturas de las especies *C. univittatus* (11.3%) y *C. circumscriptus* (8.0%) comparado con los porcentajes de capturas de estas dos especies en las otras dos trampas ($\approx 2.5\%$) (Tabla 3). *C. impunctatus* fue capturado tan solo por la trampa mini-CDC.

Tabla 3. Número de muestreos por trampa (*N*), número total de capturas y media de capturas por noches junto con su error estándar ($\bar{\chi} \pm S.E.$). Porcentaje de las especies de *Culicoides* capturados en las trampas durante el 2º periodo (16/04 al 5/06 de 2008) del 2º ensayo y en comparación con las otras tres trampas.

	Onderstepoort		Mini-CDC		Pirbright		Total
<i>N</i>	12		12		12		
Capturas	1423 (30,3%)		2321 (49,5%)		820 (17,5%)		4691
$\bar{\chi} \pm S.E.$	98,9 \pm 30,1		193,4 \pm 67,5		78,9 \pm 23,2		
Especies	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)
Compl. Obsoleteus	74,9	31,9	76,9	51,9	60,5	16,2	72,6
<i>C. univittatus</i>	2,4	18,0	2,2	26,3	11,3	55,7	4,1
<i>C. newsteadi</i>	18,1	32,4	16,8	48,0	16,6	19,5	17,4
<i>C. circumscriptus</i>	2,5	20,9	2,7	35,6	8,0	43,5	3,8
<i>C. imicola</i>	0,1	14,3	0,3	85,7	0,0	0,0	0,1
<i>C. impunctatus</i>	0,0	0,0	0,04	100,0	0,0	0,0	0,02
<i>C. jumineri</i>	1,9	31,1	1,2	30,0	3,6	38,9	1,9

* Porcentaje de capturas en relación a las capturas totales de la especie en las cuatro trampas

Entre los dos periodos de captura realizados en este segundo ensayo se observaron diferencias significativas en el número de *Culicoides* colectados. La trampa Onderstepoort incrementó sus capturas en el segundo periodo 6.2 veces, mientras que el incremento de capturas de las trampas mini-CDC y Pirbright fue del 12.6 y 10.2 respectivamente.

3.3.3 3º Ensayo: (1 octubre - 20 noviembre 2008)

Este ensayo se realizó durante el otoño del 2008 para comprobar si se mantenían los resultados preliminares obtenidos el año anterior. Durante este periodo se realizaron un total de 16 muestreos capturando 1196 *Culicoides* pertenecientes a siete especies. El 96% de las capturas se obtuvo durante las primeras 10 noches del ensayo (1/10 al 27/10 de 2008).

La trampa Onderstepoort capturó un total de 836 *Culicoides* con una media de capturas de 90 *Culicoides*/noche. La trampa mini-CDC capturó un total de 247 *Culicoides* con una media de 27 *Culicoides*/noche y la trampa Pirbright capturó un total de 109 *Culicoides* y obtuvo una media de capturas de 12 *Culicoides*/noche (Fig. 20). Estos resultados coincidieron con los obtenidos el año anterior.

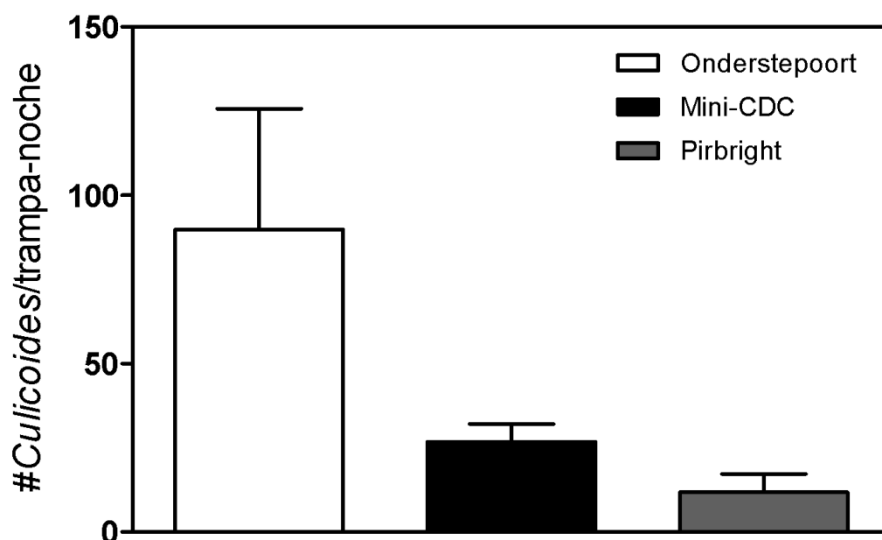


Figura 20. Media de Capturas de *Culicoides* junto con su error estándar en las diferentes trampas durante el 3^{er} ensayo (1/10 al 20/11 de 2008)

En ocho noches la trampa Onderstepoort obtuvo un mayor número de capturas que las otras dos trampas. La trampa mini-CDC capturó un mayor número de *Culicoides* en cuatro de las noches y la trampa Pirbright no superó a ambas trampas en ninguna de las noches de muestreo (Fig. 21).

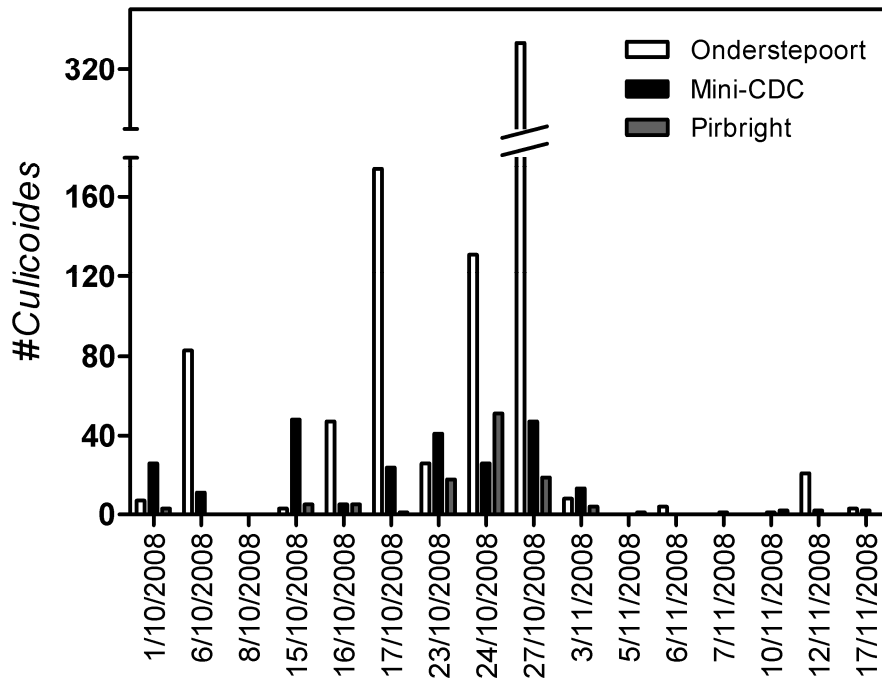


Figura 21. Se muestra el número total de *Culicoides* por trampa noche para cada una de las trampas durante el tercer ensayo (01/10 al 17/11 de 2008).

Durante el tercer ensayo, la trampa Onderstepoort capturó un mayor número de *Culicoides* (69.9% del total de capturas) que las trampas mini-CDC (19.9%) y Pirbright (9.2%) (Tabla 4). Según el test de Fisher se observaron diferencias significativas entre las capturas obtenidas por la trampa Pirbright y las otras dos trampas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las capturas de las trampas Onderstepoort y mini-CDC.

Tabla 4. Número de muestreos por trampa (*N*), número total de capturas y media de capturas por noches junto con su error estándar ($\bar{X} \pm S.E.$). Porcentaje de las especies de *Culicoides* capturados en las trampas durante el 3er ensayo (1/02 al 20/11 de 2008) y en comparación con las otras tres trampas.

<i>N</i>	Onderstepoort		Mini-CDC		Pirbright		Total
	9		9		9		
Capturas	835 (69,8%)		248 (20,7%)		113 (9,4%)		1196
$\bar{X} \pm S.E.$	89,8 \pm 35,9		29,6 \pm 5,2		12,9 \pm 5,7		
Especies	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)
Compl. Obsoletus	4,2	74,5	4,4	23,4	0,9	2,1	3,9
<i>C. newsteadi</i>	85,6	70,9	79,0	19,4	86,7	9,7	84,4
<i>C. circumscriptus</i>	1,4	42,9	4,8	42,9	3,5	14,3	2,3
<i>C. imicola</i>	5,0	82,4	2,8	13,7	1,8	3,9	4,3
<i>C. paolae</i>	0,5	57,1	0,8	28,6	0,9	14,3	0,6
<i>C. maritimus</i>	2,3	59,4	4,0	31,3	2,7	9,4	2,7
<i>C. jumineri</i>	1,0	36,4	4,0	45,5	3,5	18,2	1,8

* Porcentaje de capturas en relación a las capturas totales de la especie en las cuatro trampas

Las siete especies de *Culicoides* (*C. imicola*, Compl. Obsoletus, *C. newsteadi*, *C. maritimus* (Kieffer 1924), *C. jumineri*, *C. paolae* (Boorman 1996) y *C. circumscriptus*) se encontraron en las tres trampas.

C. newsteadi fue la especie predominante durante esta época del año (84.4% del total de capturas). La segunda especie más abundante fue *C. imicola* (4.3% del total). Comparando los resultados de este ensayo con los del año anterior se obtuvo un porcentaje bajo de capturas de *C. imicola*, pasando de $\approx 25\%$ para las trampas Onderstepoort y mini-CDC en 2007 a un porcentaje $< 6\%$ para ambas trampas durante el 2008. No se observaron diferencias en las capturas de *C. newsteadi* y *C. imicola* en relación a las otras especies entre las tres trampas.

El porcentaje de *C. obsoletus* resultó similar al obtenido el año anterior oscilando entre 0.9% (Pirbright) y el 4.4% (mini-CDC) (Tabla 4).

3.3.4 - Estado gonotrófico de las principales especies vectoras

Se analizó el estado gonotrófico de las capturas de especies de *Culicoides* importantes desde el punto de vista epidemiológico, como son en España, las especies del Complejo Obsoletus y *C. imicola*. Las capturas de *C. imicola* no fueron suficientes como para

realizar un análisis estadístico. Por tanto, en la Tabla 5, se muestran los datos de las poblaciones del complejo *Obsoletus*.

Las tres trampas capturaron principalmente hembras nulíparas y paras. En primavera, cuando se incrementan las poblaciones de la mayor parte de las especies de *Culicoides*, la ratio de capturas nulípara/para observado en el complejo *Obsoletus* fue 3.7 en las trampas Onderstepoort y mini-CDC y de de 3.0 en la trampa Pirbright. La ratio nulíparas/grávidas fue de 15.6 en la trampa mini-CDC, 9.4 en la Onderstepoort y 18.0 en la Pirbright. La ratio nulíparas/machos fue de 13.1 en la trampa Onderstepoort, 24.6 en la mini-CDC y 6.4 en la Pirbright (Tabla 5). Las hembras grávidas y los machos constituyeron <10% de las capturas en las trampas Onderstepoort y Pirbright. Sin embargo, la captura de machos fue del 10.1% en la trampa Pirbright.

Tabla 5. Porcentaje de *Culicoides* del complejo *Obsoletus* capturados en cada una de las trampas durante los tres periodos del año de 2008.

	Total	% Nulíparas	% Paras (N/P)*	% Grávidas (N/G)**	% Machos (N/M)***
<i>Febr.-Marzo 08</i>					
Mini-CDC	44	61,4	15,9 (3,8)	22,7 (2,7)	0
Onderstepoort	155	43,9	36,8 (1,2)	18,0 (2,4)	1,3 (33,7)
Pirbright	33	48,5	21,2 (2,3)	27,3 (1,8)	3,0 (16,0)
<i>Abril-Jun. 08</i>					
Mini-CDC	1756	72,9	19,5 (3,7)	4,7 (15,6)	3,0 (24,6)
Onderstepoort	1011	68,8	18,6 (3,7)	7,3 (9,4)	5,2 (13,1)
Pirbright	503	64,6	21,7 (3,0)	3,6 (18,0)	10,1 (6,4)
<i>Oct.-Nov.08</i>					
Mini-CDC	11	72,7	27,3 (2,7)	0	0
Onderstepoort	35	71,4	25,7 (2,8)	2,9 (25,1)	0
Pirbright	1	100	0	0	0
TOTAL	3549	63,3	20,3 (3,1)	6,3 (10,1)	4,5 (14,1)

* Ratio Nulípara/Para ** Ratio Nulípara/Grávida *** Ratio Nulípara/Macho

Durante el periodo de primavera se observaron diferencias significativas entre las capturas de hembras nulíparas en relación con los demás estados gonotróficos y con los machos en las tres trampas. También se encontraron diferencias entre las capturas de

hembras paras y machos en la trampa mini-CDC y entre las capturas de hembras paras y grávidas en la trampa Pirbright (Tabla 5). Las capturas de las especies del complejo *Obsoletus* durante los periodos de otoño e invierno fueron demasiado bajas como para aplicar estadísticas.

3.3.5 - Capturas según sitio

Durante el primer ensayo, las capturas máximas para cada trampa se obtuvieron en el sitio número 2 para las trampas Onderstepoort (159 individuos), mini-CDC (24 individuos) y Pirbright (21 individuos), mientras que para la trampa Rieb la captura máxima (11 individuos) se obtuvo en el sitio número 1 (Fig. 13).

Durante el primer periodo del segundo ensayo, la captura de mayor número de individuos para la trampa Onderstepoort se obtuvo en el sitio número 3 (124 ejemplares), mientras que para las trampas mini-CDC y Pirbright se obtuvo en el sitio número 1 (21 y 40 ejemplares respectivamente). Durante el segundo periodo del segundo ensayo, el mayor número de capturas se obtuvo en el sitio número 2 para las tres trampas ensayadas (431 ejemplares para la Onderstepoort, 800 ejemplares para la mini-CDC y 275 ejemplares para la trampa Pirbright) (Fig. 11).

Durante el tercer ensayo, la captura de mayor número de *Culicoides* para las trampas Onderstepoort (329 individuos) mini-CDC (48 individuos) y Pirbright (51 individuos) se obtuvo en el sitio número 2 (Fig. 13).

Se observaron diferencias significativas entre las capturas obtenidas por las trampas en cada uno de los sitios de muestro ($\alpha=0,317$ U Mann-Whitney test) obteniéndose un número mayor de capturas en la posición número 2 (Fig. 13).

3.4 DISCUSIÓN

El presente estudio ofrece los primeros trabajos a nivel nacional y europeo de captura de distintas especies de *Culicoides* según diferentes trampas de luz.

La discusión se ha centrado en las especies de vectores más relevantes para la Península Ibérica y Baleares debido a su importancia epidemiológica (*C. imicola* y las incluidas en

el complejo *Obsoletus*). El resto de especies capturadas en el presente estudio no han demostrado, hasta la fecha, ningún papel importante en la transmisión de la LA en España y Europa.

- *C. imicola*

Las trampas Onderstepoort y mini-CDC capturaron un elevado porcentaje de esta especie (21.2% de las capturas totales) durante el primer ensayo (18/10-19/11/2007), pero no (<1% de las capturas totales) en el segundo (18/02-05/06/2008). Estos resultados confirman los estudios de Miranda y colaboradores que sitúa el pico de abundancia de esta especie durante los meses de septiembre y octubre en nuestra región (Miranda *et al.*, 2004), confirmando la utilidad de estas trampas para la captura de esta especie vectora. La especie *C. imicola* está considerada como el principal vector de LA en España, ya que ha sido relacionado con la transmisión de los serotipos 1, 2, 4 y 16 (Boorman, 1991; Venter *et al.*, 1998; Allepuz *et al.*, 2010). Además, se ha comprobado que este vector está expandiendo su área de distribución hacia el norte de la Península (Purse *et al.*, 2005; Calvete *et al.*, 2006).

Durante el tercer ensayo (01/10/08 al 17/11/08), los niveles poblacionales de *C. imicola* fueron anormalmente bajos (4.3% de las capturas totales) comparado con sus capturas durante el primer ensayo y con su abundancia observada en años anteriores (Miranda *et al.*, 2004), reflejando una dinámica poblacional variable.

Las capturas de la trampa Onderstepoort en el presente estudio fueron más de tres veces superiores a las capturas de las otras trampas únicamente durante las épocas de elevado nivel poblacional de *C. imicola* (Tabla 1), mientras que en periodos en que las poblaciones de este vector eran bajas las tres trampas se mostraron igual de sensibles en la captura de esta especie (Tablas 2, 3 y 4). Sin embargo, los resultados de comparación de trampas obtenidos por Venter y col. indicaron que las capturas de la trampa Onderstepoort fueron más de tres veces superiores a las de las otras trampas (mini-CDC, Rieb y Pirbirght) tanto en condiciones de alto como de bajo nivel poblacional (Venter *et al.*, 2009). Las poblaciones de *Culicoides* colectadas en el ensayo realizado en Sudáfrica estaban compuestas en más de un 90% por *C. imicola*, mientras que la contribución de este vector en las capturas obtenidas en el presente estudio fueron < 20%. Tanto en los resultados obtenidos en este estudio como en los indicados por Venter y col. se observa

que la trampa Onderstepoort es la que mayores capturas obtiene sobre las demás trampas cuando las poblaciones de *C. imicola* se encuentran en su pico poblacional. Por tanto, en el sur de Europa sería la trampa más adecuada para la captura de *C. imicola*, especialmente para estudios de competencia vectorial o de análisis de su carga patógena.

- Complejo Obsoletus

Según los resultados obtenidos en el presente estudio, durante el periodo primavera-verano, cuando las especies predominantes de *Culicoides* en campo pertenecen al complejo Obsoletus, la trampa más efectiva en la captura es la mini-CDC (Tabla 2). Esta especie no está presente entre las capturas realizadas por Venter y col. (2009) en su estudio de comparación de trampas de luz y puede ser el motivo por el cual la trampa Onderstepoort se mostrara más efectiva que la mini-CDC en la captura de *Culicoides* durante el periodo de primavera-verano (cuando la especie mayoritaria era *C. imicola*). Las especies más abundantes capturadas mediante trampas de luz U.V. en Europa pertenecen al complejo Obsoletus y pueden constituir hasta el 80% de las capturas totales en Francia, hasta el 50% en el R.U. y hasta el 90% en el norte de Italia (Goffredo *et al.*, 2008). La especie *C. obsoletus* es también la especie más capturada en los Países Bajos (Meiswinkel *et al.*, 2008), Bélgica (Losson *et al.*, 2007) y Alemania (Mehlhorn *et al.*, 2009). Dos especies de este complejo (*C. obsoletus* y *C. scoticus*) han demostrado su potencial como vectores (Savini *et al.*, 2005), por tanto, la captura de ejemplares del complejo Obsoletus para la detección de infecciones con VLA es importante en estudios epidemiológicos. Los resultados de este estudio están en consonancia con los datos otras publicaciones que indican bajos niveles poblacionales del complejo Obsoletus durante otoño-invierno y elevados niveles en primavera (Miranda *et al.*, 2003). Por tanto, en el sur de Europa la trampa mini-CDC sería la más indicada para la captura de las especies del complejo Obsoletus durante primavera-verano.

- Especificidad en las capturas

Las diferencias estructurales y de emisión de luz de las trampas utilizadas en el presente estudio pudieron ser la causa por la que determinadas especies de *Culicoides* se vieran

más atraídas por un tipo de trampa u otro. Este motivo puede explicar que se capturara una mayor proporción de *Culicoides* con la trampa Onderstepoort en dos de los ensayos (cuando las especies dominantes en la población eran *C. newsteadi* y *C. imicola*), mientras que en el otro ensayo (cuando las especies dominantes pertenecían al complejo *Obsoletus*) la trampa mini-CDC fuera la que obtuvo un mayor número de capturas.

La trampa más efectiva a la hora de capturar *Culicoides* en las diferentes temporadas del año puede depender de la composición de las poblaciones de *Culicoides* a nivel específico y de su comportamiento hacia las distintas trampas. Bishop y col. demostraron las diferentes respuestas de varias especies de *Culicoides* dependiendo del espectro de emisión de distintos diodos emisores de luz (LEDs) (Bishop *et al.*, 2004). Así mismo, Lloyd y col. mostraron que dos especies de *Culicoides* (*C. furens* y *C. mississippiensis*) eran atraídas preferentemente por diferentes trampas de CO₂ con características similares (MM-Freedom y MM-Liberty Plus). Las pequeñas variaciones en cuanto a temperatura y emisión de CO₂ fueron posiblemente las causas de las diferentes propiedades de atracción de determinadas especies de *Culicoides* en cada trampa (Lloyd *et al.*, 2008). La trampa Onderstepoort presenta el doble de potencia de emisión (8W) de luz U.V. que las otras dos trampas (4W) y mayor capacidad de desplazamiento de aire de su ventilador, lo que posiblemente condiciona una mayor atracción y captura de insectos cuando las poblaciones de *Culicoides* son bajas. Sin embargo, cuando las poblaciones son altas, en nuestra región no se precisa una mayor potencia de emisión de luz o aspiración, ya que la trampa mini-CDC fue capaz de capturar un 63% más *Culicoides* que la Onderstepoort. La especificidad de captura de la trampa mini-CDC hacia las especies del complejo *Obsoletus* pudieron ser la causa por la cual esta trampa obtuviera un mayor número de capturas que las otras trampas. La trampa Pirbright fue la menos eficaz en cuanto a número de capturas, sensibilidad y composición específica en relación a las otras dos trampas ensayadas, probablemente debido a su fuente de luz (bombilla incandescente de 4W) que parece resultar menos atrayente para las distintas especies de *Culicoides* que la luz U.V. utilizada en las otras trampas. Por tanto, las trampas Onderstepoort o mini-CDC serían más indicadas que la trampa Pirbright para estudios de monitorización de las poblaciones de *Culicoides* o para la captura de un elevado número de ejemplares necesario en estudios de competencia vectorial.

Cuando las trampas de luz se sitúan en zonas cercanas a los animales, se debe tener en cuenta que no se conoce el porcentaje de la población de *Culicoides* que dichas trampas interceptan y que posiblemente, tan solo se captura una pequeña proporción de la población total. El porcentaje de capturas en relación a la población total de estos dípteros varía con cada trampa y no se conoce exactamente. La comparación de capturas obtenidas mediante trampas de luz con las de otros métodos de muestreo (trampas de CO₂, muestreo directo sobre animales, 'truck-trapping') demuestran importantes variaciones tanto en número de individuos como en número de especies (Holbrook y Wuerthele, 1984; Anderson y Linhares, 1989) y algunas especies que podrían ser importantes en la transmisión de la enfermedad de la LA (ej. *C. chiopterus*) son subestimadas (Carpenter *et al.*, 2008). De hecho, en estudios comparativos realizados en Sudáfrica con otros métodos de muestreo y teniendo en cuenta el elevado número de *Culicoides* en las poblaciones de esa región, estimaron que las capturas obtenidas mediante trampas de luz eran inferiores al 0.0001% de la población total (Meiswinkel *et al.*, 2004). Sin embargo, los resultados obtenidos con trampas de luz son constantes año tras año tanto a nivel de especies como de número y se consideran el método más práctico que tenemos hoy en día para determinar la abundancia y composición específica de las poblaciones de *Culicoides*, aunque no se conozca de manera profunda la variedad de factores que pueden influenciar sus capturas.

- Influencia del emplazamiento de las trampas

Analizando los datos obtenidos durante el muestreo completo se puede observar que existe una posición (de las cuatro elegidas durante los ensayos) en la cual cada una de las trampas obtiene claramente un mayor número de capturas en comparación con los otros dos emplazamientos elegidos (sitio 2; Fig. 13). Existe por lo tanto un claro **efecto por sitio** reflejado en las desviaciones obtenidas. La rotación de las trampas permite la comparación entre ellas ya que todas han pasado el mismo número de noches (menos en el primer ensayo) por cada uno de los sitios. La presencia de lugares de cría cercanos o la de 'pasillos aéreos' utilizados por estos insectos, pueden ser las principales razones por las cuales una misma trampa capture una cantidad significativamente mayor de *Culicoides* en un sitio que en otro cercano. Teniendo en cuenta la normativa de la UE en

la que se declara situación de riesgo epidemiológico a partir de la captura de 5 hembras vectoras paras, **el efecto de capturas por sitio** es un factor a tener muy en cuenta a la hora de colocación de las trampas en las explotaciones ganaderas, ya que puede determinar la inmovilización de los animales.

Los enclaves más apropiados para la colocación de las trampas para *Culicoides* están situados fuera de los establos, en lugares cercanos a los animales, preferentemente en las zonas de reposo nocturno y en lugares donde no haya impedimentos que eviten el paso de la luz de la trampa.

- Análisis del estado gonotrófico

Cabe destacar que es la primera vez que se presentan resultados sobre la estructura poblacional de las hembras de las especies del complejo *Obsoletus* en la región mediterránea. Como se observa en la Tabla 5, las capturas de hembras paras de las especies del complejo *Obsoletus* fueron aproximadamente tres veces inferiores a la captura de nulíparas en las tres trampas. Las trampas de luz atraen principalmente hembras nulíparas y paras (ej. *C. imicola* (Venter, 2007)), que son las que acuden a las zonas donde están los animales con el propósito de nutrirse de sangre. La importancia de la determinación del estado gonotrófico de las hembras radica en que, en principio, solo las hembras paras (que ya se han alimentado y han completado un ciclo gonotrófico) son capaces de transmitir el virus (EFSA, 2008). Por tanto, la sensibilidad de las trampas en la captura de hembras vectoras paras es importante en los estudio epidemiológicos. Tanto la trampa Onderstepoort como la mini-CDC obtuvieron el mismo ratio nulípara/para en la captura de las especies vectoras del complejo *Obsoletus* durante primavera, cuando las poblaciones de estas especies son elevadas (Tabla 5). Sin embargo, durante otoño-invierno, aunque el ratio nulípara/para fue mayor en la capturas realizadas por la trampa mini-CDC, el número total de hembras paras capturadas por la trampa Onderstepoort fue ocho veces mayor que la mini-CDC. Por ello, la trampa Onderstepoort debería ser la trampa de elección en los estudios de monitorización realizados en invierno debido a sus sensibilidad en la captura de hembras paras del vector durante los periodos de baja densidad poblacional. Existe muy poca información sobre la variabilidad en la respuesta al estímulo lumínico de las trampas en función del estado gonotrófico del insecto, o el efecto que puede tener la proximidad de los animales o los hábitos que adquieren los

Culicoides una vez se ha modificado su estado gonotrófico y por tanto su fisiología. Sin embargo, se conoce que las capturas elevadas de hembras nulíparas en comparación con las de hembras paras son indicativas de crecimiento poblacional. A medida que llega el invierno el ciclo biológico de los *Culicoides* se ralentiza a causa de las bajas temperaturas, se detecta una mayor proporción de hembras paras, y la población envejece rápidamente (Lysyk, 2007).

Los machos de las especies de *Culicoides* no necesitan ingerir sangre y por tanto no acuden donde están los animales (o las trampas, tal como se aprecia en la Tabla 5). La presencia de abundantes capturas de machos suele ser un indicativo de sitios de cría cercanos.

- Hibernación

Las capturas que se han obtenido en el presente estudio de hembras nulíparas durante el invierno de 2008 sugieren la continua emergencia de un pequeño número de individuos, como ya han aportado autores de otras regiones (Hunt *et al.*, 1989; Gerry y Mullens, 2000; Wittmann, 2000). Por otro lado, las capturas obtenidas de hembras paras en los meses de invierno indican que algunas de las hembras nulíparas pueden sobrevivir y alimentarse durante parte o todo el invierno y coinciden con los trabajos de Goffredo y Meiswinkel en Italia y con los trabajos de Lysyk y Danyk realizados con especies de *Culicoides* de EE.UU. y Canadá (Goffredo y Meiswinkel, 2004; Lysyk y Danyk, 2007). Estos resultados tienen una gran relevancia, ya que son indicativos de la existencia de adultos que son capaces de emerger y sobrevivir en condiciones invernales y, en el caso de alimentarse de animales virémicos domésticos o silvestres, podrían prolongar un ciclo de transmisión de tipo subclínico. Las distintas especies del complejo *Obsoletus* pueden ser capturadas todo el año, no solo en Mallorca (Miranda *et al.*, 2004), sino también en otras regiones del sur y norte de Europa (Rawlings y Mellor, 1994; Losson *et al.*, 2007). De hecho, la ausencia completa de *Culicoides* durante el invierno, según los datos obtenidos mediante trampas de luz, está restringida a ciertas especies afro-tropicales, como *C. imicola*, en algunas regiones del sur de Europa. En otras, la ausencia de *Culicoides* es muy corta (<15 días) o ausente (Ortega *et al.*, 1998; Miranda *et al.*, 2004; Calvete *et al.*, 2006). El descenso de las temperaturas durante la estación fría reduce las

poblaciones de insectos así como el riesgo de transmisión del VLA. Sin embargo, durante la mayor parte del periodo invernal en nuestra región, las condiciones ambientales no son lo suficientemente severas como para suprimir completamente el riesgo epidemiológico, ya que según nuestro estudio más de cinco hembras paras de *Culicoides* se pueden capturar por noche con la trampa Onderstepoort. En estas circunstancias, el VLA es capaz de completar su periodo de incubación extrínseco en el vector cuando las temperaturas ambientales se mantienen sobre los 12°C (Wittman *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2007) o, en el caso de que las temperaturas sean menores, mantenerse en estado quiescente esperando mejores condiciones para completar su ciclo replicativo (Mullens *et al.*, 1995; Paweska *et al.*, 2002).

La captura de *Culicoides* durante la época invernal es importante para la determinación del Periodo de Bajo Riesgo de Transmisión y para el esclarecimiento de los mecanismos de hibernación de los vectores y del virus. Este periodo se basa principalmente en la ausencia de vectores adultos capturados en trampas de luz y en la determinación de un cierto umbral de abundancia de *Culicoides* en relación con los datos climatológicos de la zona y el conocimiento de la curva estacional de los vectores durante al menos dos años (EFSA, 2008). En este estudio, las trampas mini-CDC y Pirbright capturaron <5 hembras paras de vector por noche durante los meses de baja densidad poblacional, mostrándose menos sensible que la trampa Onderstepoort en la detección del Periodo de Bajo Riesgo de Transmisión que podría afectar al movimiento de los animales en la región, con las consiguientes pérdidas económicas (EFSA, 2008).

4. Recovery rates of Bluetongue virus
serotype 1, 2, 4 and 8 Spanish strains
from orally infected C. imicola in
South Africa

Presentación

El siguiente ensayo se realizó en la región de Onderstepoort (Pretoria; Sudáfrica) debido a que los estudios que se pretendían realizar requerían la captura de un elevado número de *Culicoides*. La región en donde se sitúa el centro de investigación de Onderstepoort (Agricultural Research Center - Onderstepoort Veterinary Institute), laboratorio de referencia de la OIE en estudios de investigación de *Culicoides*, cuenta con elevadas poblaciones de *Culicoides*, en especial de la especie vectora *C. imicola*, durante gran parte del año. En el ensayo que se detalla a continuación se trabajó bajo la supervisión del Dr. Venter, investigador principal del ARC-OVI, que cuenta con gran experiencia en estudios de competencia vectorial y susceptibilidad oral. Este trabajo, que se presenta en formato Word, ya se encuentra publicado. La versión en *pdf* del artículo puede encontrarse en el Anexo 9.1.

4. Recovery rates of bluetongue virus serotype -1, -2, -4 and -8 Spanish strains from orally infected *Culicoides imicola* in South Africa

R. del R o¹, M.A. Miranda¹, C. Paredes-Esquivel¹, J. Lucientes², C. Calvete³, R. Estrada² and G.J. Venter^{4,5}

¹ Laboratory of Zoology and Emerging Diseases, UIB–IUNICS, Cra. Valldemossa km 7.5, Palma de Mallorca, Illes Balears, Spain CP: 07122,

² Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria de Zaragoza, Zaragoza, Spain,

³ Unidad de Sanidad y Producción Animal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA), Gobierno de Aragón, Zaragoza, Spain.

⁴ Parasites, Vectors and Vector Borne Diseases, Agricultural Research Council – Onderstepoort Veterinary Institute, Onderstepoort 0110, South Africa,

⁵ Department of Veterinary Tropical Diseases, University of Pretoria, Onderstepoort 0110, South Africa.

4.1 ABSTRACT: Bluetongue (BT) is an infectious disease of ruminants that has spread northwards in Europe during the last decade. The aetiological agent of the disease is an arbovirus (Bluetongue) which belongs to the genus *Orbivirus* (family Reoviridae) and it is transmitted by certain species of biting midges within the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). Information regarding the vector status of the *Culicoides* species in a specific area will be essential to predict the risk of a BTV incursion. Field collected *Culicoides* (*Avaritia*) *imicola* Kieffer from South Africa were fed on blood containing several Spanish isolates of BTV. Despite the high virus concentrations in the blood meal (5.1-6.4 log₁₀ TCID₅₀/ml of blood), virus was recovered from <1% of midges assayed after incubation. Virus concentrations >2.5 log₁₀ TCID₅₀/midge in individual infected *C. imicola* suggest virus replication with possible risk of transmission to susceptible vertebrate hosts in the field for at least two of the serotypes assayed (BTV1 and BTV2). A third serotype (BTV4) was very close to the estimated threshold of transmission. The relatively low to near refractory status of *C. imicola* compared to other vector species like *C. bolitinos* supports previous results, indicating that *Culicoides* species other than *C. imicola* may play a more important role in the epidemiology of BTV.

Keywords: *Culicoides imicola*, bluetongue virus, infection rate, oral susceptibility, vector capability

4.2 INTRODUCTION

Bluetongue (BT) is an infectious viral disease of wild and domestic ruminants that can severely affects domestic sheep and sometimes cattle. The causative agent, bluetongue

virus (BTV), genus *Orbivirus*, family Reoviridae (Borden *et al.*, 1971), is transmitted by several *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) (Mellor *et al.*, 2000). Before 2000 BTV was believed to be restricted to an area between 40°N and 35°S (Walton, 2004), however, during the last decade, it has expanded northwards in Europe up to 50°N (OIE, 2006; Carpenter *et al.*, 2009). This expansion of the infection and associated vectors has been postulated as partly ascribed to climate change (Purse *et al.*, 2005).

24 BTV serotypes of the virus are recognised worldwide (OIE, 2009), however, recent studies seem to indicate that two more serotypes could be implicated in the epidemiology of the disease (Hofmann *et al.*, 2008c; Maan, 2011). BTV-10 was the first to be recorded in mainland Spain between 1956 and 1960. The outbreaks occurred during those years were attributed to infected *Culicoides* transported by wind from North Africa resulting in the death of more than 100000 sheep (Manso-Ribeiro & Noreña, 1958; Campano-Lopez & Sanchez-Botija, 1958, Sellers *et al.*, 1978). Forty years later, in October 2000, bluetongue disease struck Spain again. The serotype was identified as BTV-2 and caused 305 outbreaks in the Balearic Islands (Miranda *et al.*, 2003). Three years later, BTV-4 was reported in the eastern part of Menorca, and in October 2004 in mainland Spain affecting the province of Cádiz and spreading rapidly north and south (Gómez-Tejedor, 2004). Despite vaccination with live-attenuated BTV-4 vaccine (Gómez-Tejedor, 2004), this serotype continued to spread northwards during the summer of 2005 into provinces in Andalucía, Castilla la Mancha, Castilla y León, Extremadura and Madrid. In addition, BTV-2 was also isolated from sentinel cattle in Spain in 2005 (Mellor *et al.*, 2008). In 2007 another serotype, BTV-1, appeared for the first time in Andalucía (Allepuz *et al.*, 2010) and in 2009 it spread to the northwest causing 240 outbreaks in cattle and sheep (Sabirovic *et al.*, 2009). In January 2008, BTV-8 occurred in northern Spain and spread to the southern part of the Iberian Peninsula in October 2008 (Lorca *et al.*, 2011).

Based on its confirmed vector status and host preference for large livestock, the Afro-Asiatic *Culicoides (Avaritia) imicola* Kieffer is considered to be the principal vector of BTV in South Africa (Nevill *et al.*, 1992ab; Meiswinkel *et al.*, 2004) and also across vast geographic regions of Africa and southern Europe (Mellor *et al.*, 1985; Boorman, 1986; Mellor, 1992; Mellor *et al.*, 2000, 2009). The oral susceptibility of *C. imicola* to various strains of BTV has been demonstrated on several occasions in the laboratory (Venter *et al.*, 2010). Field isolations of BTV from this species also support laboratory results

(Meiswinkel *et al.*, 2004; Venter *et al.*, 2006).

Distribution and modelling studies of *C. imicola* in Spain showed that outbreaks of BTV in 2007 were almost exclusively restricted to areas with high numbers of this species (Acevedo *et al.*, 2010). Nevertheless, about 5% of those localities, where *C. imicola* was predicted to be absent, had experienced at least one outbreak of BTV in the past (Acevedo *et al.*, 2010). In addition, recent studies conducted in Europe associate transmission of several serotypes of the virus with *Culicoides* species belonging to the Pulicaris and Obsoletus groups (Mellor & Pitzolis 1979; Savini *et al.*, 2005; Ferrari *et al.*, 2005).

In order to elucidate the role of the proven vector *C. imicola* in the epidemiology of BTV, the oral susceptibility of this species for those BTV serotypes circulating in Spain was determined.

4.3 MATERIAL AND METHODS

Viruses and insects

In the absence of either large populations or laboratory colonies of *C. imicola* in Spain which are necessary for conducting this type of trial, adults of this species were collected in South Africa using the Onderstepoort black light trap as described by Venter *et al.* (1998). Traps were placed close to cattle stabled at the Agricultural Research Council-Onderstepoort Veterinary Institute (25°29' S, 28°11' E; 1219 m a.s.l.) in South Africa.

Field collected *Culicoides* midges were fed on blood-BTV mixtures between April and May 2009 in nine separate feeding attempts.

The four BTV serotypes responsible for recent outbreaks in Spain (BTV-1, -2, -4 and -8) were obtained from the National Reference Laboratory in Algete, Madrid (Spain). Stocks of virus for infection studies were grown in baby hamster kidney cells (BHK-21). Viruses were titrated and stored as described by Venter *et al.*, 1998. The details of each are shown in Table 6.

Table 6. Virus serotypes, year of isolation and passage history of the Spanish BTV isolates used for the oral infection of field collected *Culicoides* midges

Virus Serotype	Strain identification	Year of isolation	Passage history*
BTV-1	SPA/07	2007	1P Vero
BTV-2	R23/00	2000	2P BHK-21
BTV-4	SPA/04	2004	3P BHK-21
BTV-8	Segovia		2P BHK-21

* Number of passages in baby hamster kidney cells (BHK-21) or Vero cells

Feeding technique

After acclimatization in the insectary for 2-3 days at 23.5°C and 50-70% RH, field-collected midges were held without nutrients nor water for 24 hours before blood feeding. 5ml of stock virus was mixed, immediately before feeding, with 5ml of blood obtained from a BTV antibody negative sheep. Sheep used for oral susceptibility studies were kept under insect free conditions and were monitored daily for disease symptoms in order to prevent any field virus infections of the animals. Flies were fed through one-day-old chicken skin membrane in batches of 250–300 for 30–45 minutes on defibrinated blood containing one of the four serotypes (Venter *et al.*, 1998). During feeding, lighting in the room was dimmed to $\approx 1\%$ daylight (≈ 65 lux) while the blood-virus mixture was maintained at 35.5°C and stirred continuously to prevent settling of blood cells (Venter *et al.*, 1998).

After feeding, midges were immobilized at -20°C for about a minute. Blood-engorged females were separated out on a chill-table and kept in 250 ml unwaxed paper cups, closed with fine mesh, at 23.5°C and 50–70% relative humidity at $\approx 1\%$ daylight for the 10-day extrinsic incubation period. *Culicoides* females were maintained on 5% (w/v) sucrose solution and, in order to improve the survival rate, 500 IU penicillin, 500 μg streptomycin and 1.25 μg fungizone per ml of solution was added. Females surviving the incubation period were sorted into species on a chill-table and stored individually in 1.5 ml microfuge tubes at -70°C until assayed.

Processing of Culicoides and virological assays

Midges were assayed for virus immediately after feeding (10 blood engorged midges per feeding attempt) and also after 10 days extrinsic incubation. Processing of individual midges for microtitration assays was carried out as described by Paweska *et al.* (2002).

The identity of all virus isolates was determined by a microtitre virus-neutralisation procedure (House *et al.*, 1990), using type-specific antisera produced in guinea pigs. Virus concentrations were calculated by the method of Kärber (1931). Statistical differences between experimental groups were analyzed using Chi-square analysis. *P*-values of < 0.05 were used as the cut-off for statistical significance.

4.4 RESULTS

Culicoides feeding and survival rates

Feeding rates varied from 10 to 70% and the virus concentrations in blood meals ranged from 5.1 (BTV-2) to 6.4 (BTV-1) log₁₀TCID₅₀/ml (Table 7). 3573 out of 6063 field collected midges (58.4%), fed on the four serotypes of BTV, survived the 10-day extrinsic incubation period.

Virus recovery in midges

Due to bacterial and fungal contamination, results could not be obtained neither from midges tested immediately after feeding nor from all the surviving midges assayed after incubation. The number of midges from which results could be obtained is shown in Table 7.

Only three (BTV-1, -2, -4), of the four serotypes used, were recovered from *C. imicola* after 10 days at 23.5°C. The highest virus recovery rate (0.5%) was obtained for BTV-2, while recovery rates for BTV-1 and BTV-4 was 0.2%. No significant difference ($\chi^2=2.543$, d.f=3, *P*=0.467) in the infection prevalence for the four different serotypes was obtained. All isolates from infected midges were serotyped as the same used to spike the blood.

Virus titres in the infected midges ranged from 1.4 to 3.9 \log_{10} TCID₅₀/midge (mean 2.2 \log_{10} TCID₅₀/midge). Titres of at least 2.5 \log_{10} TCID₅₀/midge were demonstrated for BTV-1 and BTV-2 (Table 7).

Few specimens of *Culicoides (Avaritia) bolitinos* Meiswinkel, *Culicoides (Remia) enderleini* Cornet and Brunhes, and *Culicoides (Remia) nevillei* Cornet and Brunhes, survived the 10-day incubation period. No virus was isolated from any of those specimens (Table 7).

Table 7. Virus recovery rates and titres in field collected *Culicoides imicola*, *C. bolitinos*, *C. enderleini* and *C. nevillei* maintained for 10 days at 23.5°C after feeding on blood containing different serotypes of BTV

BTV serotype	BTV-1	BTV-2	BTV-4	BTV-8
Virus titre of blood meal (Log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	6.4	5.1	5.8	6.1
<i>C. imicola</i> (%)	1/490 ¹ (0.2%)	4/889 (0.5%)	1/404 (0.2%)	0/492 (0.0%)
Avg Virus titre/midge ²		2.5		
Range in virus titre	3.9	1.4-3.2	2.4	-
<i>C. bolitinos</i>	0/2	0/2	0/11	0/5
<i>C. enderleini</i>	0/1		0/1	0/8
<i>C. nevillei</i>				0/2

¹ No positive/No tested, ² \log_{10} TCID₅₀/midge

4.5 DISCUSSION

In the present study, field collected *Culicoides* midges were not screened for the presence of field viruses, but virus recovery from field collected vector populations is generally very low (Chiang & Reeves, 1962; Walter *et al.*, 1980; Gerry *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2006a). In a field survey conducted in South Africa (endemic for BT) from 1979 to 1985, the virus was isolated from only 526 out of 4506 *Culicoides* pools (pool size 100-100 000 individuals) (Nevill *et al.*, 1992a). Using an average of 1000 midges per pool, the field infection prevalence would be 0.06%. The whole South Africa is endemic for BT and during the time of the study no cases of BT were reported. For these reasons it is therefore likely that the infection rate obtained reflects the laboratory conditions and that any

influence by field infections should be minimal. This is supported by the fact that the identities of all serotypes recovered from the midges were the same as those used to spike the blood meal.

The infection prevalence obtained (i.e. percentage of midges from which virus could be recovered after the incubation period) was very low compared to other susceptibility studies with different strains of the virus, and ranged from 0.0% (BTV-8) to 0.5% (BTV-2). The highest recovery rate (0.5%) was obtained for BTV-2 being also the serotype with the lowest virus titre in the blood meal. Despite the relatively high virus concentration of BTV-8 in the blood meal ($6.1 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$), this serotype was not recovered from the midges after the extrinsic incubation period (Table 7). The fact that BTV-8 was not recovered from *C. imicola* does not necessarily mean that this species is refractive to infection with that serotype. Based on the number of midges assayed it can be concluded that the infection prevalence for this strain was $<0.2\%$. Statistically, the virus recovery rate of BTV-8 was not significantly different from that of the other three serotypes.

Low virus recovery rates, as an indication of vector competence, does not necessary translate to a low vector capacity for *C. imicola* with the serotypes/strains used. Based on light trap results, *C. imicola* is a widespread species in South Africa and found in very high numbers near livestock (Meiswinkel *et al.*, 2004). This super abundance and host preference of *C. imicola* can compensate for the low infection rates observed. Indeed, this species is considered to have the highest vector capacity for orbiviruses in South Africa (Nevill *et al.*, 1992b; Meiswinkel *et al.*, 2004). Although *C. imicola* in the Mediterranean basin is not as abundant as in Africa, its role as a competent vector for BTV in this area is enhanced by the presence of relatively high numbers of naïve or unvaccinated hosts due to non persistent vaccinations campaigns. Sheep in these regions, therefore, do not develop effective immunocompetent responses to the infection. The higher susceptibility of European breeds of sheep (Erasmus & Potgieter, 2009), compared to South African sheep breeds, may also play a role in the epidemiology of this disease in Europe.

The minimum level of viraemia in a host, necessary to infect *Culicoides* vectors, is not known. Based on the blood-meal size for *C. imicola* (0.01-0.06 μl) (Venter *et al.*, 2005) theoretically a minimum of $5.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ would be needed to ensure that each individual midge will be exposed to approximately one $\text{TCID}_{50}/\text{blood-meal}$. This value does not take into account the elimination of the excess of liquid taken while feeding. It

has been said that virus concentrations as low as $2.0 \log_{10}$ TCID₅₀/ml are sufficient to produce infection rates of 0.2% in *Culicoides (Avaritia) brevitarsis* Kieffer (Muller *et al.*, 1982), a species similar in size to *C. imicola*. In the USA Bonneau *et al* (2002) succeeded in infecting *Culicoides (Monoculicoides) sonorensis* Wirth & Jones by feeding them on a BTV infected sheep with no detectable viraemia ($<0.5 \log_{10}$ TCID₅₀/ml of blood). It is therefore clear that the virus titres used in the present study ($>5.1 \log_{10}$ TCID₅₀/ml of blood) were more than enough to infect all susceptible *Culicoides* and that the infection prevalence obtained is an indication of the susceptibility rate of this *C. imicola* population for the viral strains used.

Some studies show that concentrations of live virus $> 2.5 \log_{10}$ TCID₅₀/midge in its head or body is an indicator of a fully disseminated infection (Jennings & Mellor 1987; Fu *et al.*, 1999; Riegler, 2002). This threshold value ($>2.5 \log_{10}$ TCID₅₀/midge) was derived from *C. sonorensis* studies and may not be applicable for interpretation of vector competence results in other *Culicoides* species like *C. imicola*. The virus titres recorded in individual infected *C. imicola* in the present study indicate that the virus had replicated in the insect to high levels in two of the serotypes assayed (BTV1 and BTV2) and, consequently, onwards transmission to susceptible vertebrate hosts might be possible. A titre of 2.4 TCID₅₀/midge was obtained for BTV4. This value was very close to the estimated threshold of transmission in *C. sonorensis*. Due to the smaller size of *C. imicola* compared to that of *C. sonorensis* and observing that this serotype circulated in several outbreaks in Spain in areas where *C. imicola* was present (Gómez-Tejedor, 2004), it can be postulated that the Spanish strain of BTV4 could also be transmitted by the South African population of *C. imicola*.

Although the current study indicates a very low vector competence of *C. imicola* for the serotypes used, it also shows that this species is susceptible to infection with those isolates and that onwards transmission is possible. In Europe, *C. imicola* has been recorded in the Iberian Peninsula, the Balearic Islands, Greece, Italy, and the South of France and was thought to be the main vector of BTV in those areas (Miranda *et al.*, 2003; Goffredo *et al.*, 2001; Giovannini *et al.*, 2004; Sarto i Monteys *et al.*, 2005; Purse *et al.*, 2005). Climate change has created milder winter conditions in the northern regions, and recent studies describe an apparent on-going range expansion of this species northwards (Mellor & Wittmann, 2002; Calvete *et al.*, 2006). In addition to the range

expansion, milder conditions can also influence the vector competence of *Culicoides* species leading to an exponential increase in vector capacity (Mullens *et al.*, 2004).

The relatively low susceptibility results obtained in the present study support the notion that BT might be a “multi-vector” disease and this will add to the complexity of the epidemiology of BTV.

It should also be noted that the susceptibility of a single *Culicoides* population to infection with different strains of orbiviruses may differ significantly over time (e.g. BTV serotypes: Jones & Foster, 1978; African horse sickness virus serotype 7 strains: Venter & Paweska, 2007). Field populations of *Culicoides* species can vary broadly in their genetic susceptibility to BTV infection. Indeed, it has been demonstrated that some populations of the same species might be completely refractory to infection by some serotypes (Ward, 1994; Mellor, 2004b, Carpenter *et al.*, 2006). True assessment of vector competence might be difficult to calculate as it would require some level of real-time monitoring, e.g. testing local *Culicoides* populations using variants of orbiviruses in current local circulation. Thus, the current study should be repeated with the European populations of *C. imicola*, and extended to other potential vector species such as those included in the Obsoletus group, in order to assay their implication in the epidemiology of BT in places where several species of either proven or suspected and potential vectors are present. The lack of established laboratory colonies of *C. imicola* in Europe, as well as the lower population abundance of this species compared to that in Africa, may represent a serious obstacle to develop such type of oral susceptibility trials in the southern European countries.

4.6 ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partly initiated by the European Union in a project entitled: "Surveillance network of Reoviruses, Bluetongue and African Horse Sickness, in the Mediterranean basin and Europe" (MedReoNet) (Contract N 044285). We thank Concepción Gómez Tejedor and Montserrat Agüero (Laboratorio Central de Veterinaria Algete) for making the Spanish isolates available. We are thankful to Ina Hermanides, Isabel Wright, Daphney Majatladi and Solomon Boikanyo for technical assistance. We thank Eva Veronesi (IAH Pirbright) and Truuske Gerdes for constructive comments on earlier drafts

of this manuscript. We also would like to thank to the “Conselleria d’Innovació, Interior i Justícia” and to the national project called “Estudio de la competencia vectorial de las especies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vectores de la Lengua Azul en España y evaluación de la hibernación del virus en los vectores” for their economical support.

5. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD
DE CULICOIDES SPP. A LA
DELTAMETRINA

5.1 RESUMEN

La Lengua Azul (LA) es una enfermedad vírica (Orbivirus; Reoviridae) transmitida por las picaduras de hembras de varias especies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) que desde 1998, afecta de forma severa a determinados rumiantes en Europa, siendo responsable de elevados niveles de mortalidad y morbilidad. Aparte de la vacunación, la aplicación de insecticidas sobre los animales puede ser una medida profiláctica eficaz para proteger al ganado de esta enfermedad. Dichas aplicaciones podrían evitar que estos insectos llegasen a picar a los animales o, en el caso que lo hagan, impedir que vivan el tiempo suficiente como para picar una segunda vez y transmitir el VLA. Hasta el momento no existen fórmulas comerciales evaluadas específicamente contra los vectores del VLA.

El objetivo de este estudio fue evaluar la susceptibilidad de *Culicoides* spp. a la deltametrina utilizando el ensayo estándar de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

En el presente trabajo se llevaron a cabo tres tipos de ensayos.

1.- Se expusieron *Culicoides* adultos a diferentes concentraciones de deltametrina durante una hora. Los resultados indicaron que este insecticida es muy eficaz, ya que concentraciones de tan solo 0.000145% fueron suficientes para conseguir el 50% de mortalidad al cabo de 24 horas en las poblaciones de *Culicoides* ensayadas. La concentración de deltametrina necesaria para conseguir un 90% de mortalidad fue del 0.000576%.

2.- En un segundo ensayo realizado con mallas comerciales impregnadas con deltametrina a una concentración de 4.4g/kg \pm 15% se obtuvieron mortalidades de entre el 92.6-100% en poblaciones de *Culicoides* expuestas durante periodos de tiempo comprendidos entre 10 segundos y 6 minutos en cámaras de la OMS.

3.- En el tercer ensayo se evaluó la capacidad insecticida de mallas impregnadas con deltametrina a concentración de 4.4g/kg \pm 15% en condiciones de campo. Se comparó la abundancia y supervivencia de los *Culicoides* capturados por una trampa de luz

Onderstepoort rodeada por malla insecticida con las capturas y supervivencia de otra trampa del mismo tipo rodeada de una malla control sin insecticida. Los análisis de los resultados mostraron que si bien no se pueden apreciar diferencias significativas en el número de capturas entre el tratamiento y control, sí que se observan diferencias en la supervivencia de los *Culicoides* capturados por cada una de las trampas, siendo la mortalidad media de las capturas en la trampa rodeada por malla insecticida un 22.7% superior a las capturas de la trampa rodeada con malla sin insecticida.

Estos ensayos demuestran una elevada sensibilidad de los *Culicoides* a la deltametrina a las dosis ensayadas, tanto en papeles como en mallas impregnadas. Los resultados obtenidos podrían ser útiles para diseñar productos comerciales, con deltametrina en su formulación, dirigidos específicamente contra los vectores del VLA.

5.2 INTRODUCCIÓN

Desde 1998 Europa se ha convertido en una zona endémica para la Lengua Azul. Esta enfermedad ha generado pérdidas severas en rumiantes domésticos en Europa desde su establecimiento en el continente con tasas de mortalidad que oscilan entre el 3 y 5% en bovino y hasta el 40% en ovino (Conraths *et al.*, 2007; Melhorn *et al.*, 2008; Saegerman *et al.*, 2008).

Las principales especies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) consideradas capaces de transmitir el VLA en Europa son *C. imicola* en el sur (Boorman *et al.*, 1985; Mellor *et al.*, 1985), *C. obsoletus* tanto en el norte como en el sur de Europa (Ortega *et al.*, 1998; De Liberato *et al.*, 2005; Mehlhorn *et al.*, 2007) y *C. pulicaris*, *C. dewulfi* y *C. chiopterus* principalmente en el norte (Ortega *et al.*, 1998; Balenghien, 2008; Meiswinkel *et al.*, 2008; Stephan *et al.*, 2009). Se han obtenido aislamientos víricos a partir de hembras paras de las tres primeras especies, mientras que la implicación en la epidemiología de la enfermedad de las dos últimas especies mencionadas se basa en análisis de PCR (Caracappa *et al.*, 2003; Dijkstra *et al.*, 2008; EFSA, 2008; Vanbinst *et al.*, 2009). La especie más frecuente es *C. obsoletus* (EFSA, 2008), mientras que las especies *C. pulicaris* y *C. dewulfi* se encuentran aparentemente menos involucrados en la transmisión de la enfermedad (Meiswinkel *et al.*, 2007), en parte debido a sus densidades

poblacionales relativamente bajas. La sensibilidad a insecticidas de las distintas especies de *Culicoides* ha sido poco estudiada. Hasta la fecha existen pocas publicaciones en las que se examine el efecto de distintos insecticidas sobre *C. obsoletus*. En una de ellas se determinaron los valores de DL₉₀ sobre una población de estos vectores mediante el ensayo de un insecticida compuesto por un 1.7% de DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) y un 0.51% de dieldrina (Service, 1969). En un segundo estudio se analizó el efecto de telas negras impregnadas con lindano (γ -benzeno hexaclorado [BHC]) y DDT en aceite miscible a concentraciones de entre 135–2691 mg/m² en *C. obsoletus* (Hill y Roberts, 1947). En estos estudios, aunque se obtuvo una mortalidad superior al 95% durante los primeros días post-tratamiento, después de 12 días la mortalidad se redujo a un 52-82% según las concentraciones ensayadas, y después de 21 días no se apreciaban diferencias significativas entre los ensayos tratamiento y control. Los productos que se utilizaron para la realización de esos ensayos se encuentran actualmente prohibidos en la UE. Otros ensayos realizados con distintas especies de *Culicoides* determinaron que los insecticidas basados en piretroides sintéticos (PSs) son más efectivos que los productos organofosforados (OFs) (Kline y Roberts, 1981; Floore, 1985).

Hoy en día los piretroides son una herramienta importante en el control de enfermedades vectoriales en todo el mundo. Sin embargo, se tienen pocos datos sobre la eficacia de los distintos insecticidas contra las especies de *Culicoides*, ya que son productos que se han desarrollado para proteger el ganado básicamente contra moscas, mosquitos, simúlidos y/o tabánidos (Schmahl *et al.*, 2008a).

Los productos utilizados para el tratamiento de los animales pueden dividirse en tópicos, como las formulaciones *pour-on* (aplicado en el lomo del animal y que luego se extiende por todo el cuerpo), esprays (que permiten un control en la distribución del insecticida), crotales (de fácil colocación, pero de efectos no duraderos debido a que generan una nube de insecticida que aparentemente no llega en la adecuada proporción en los sitios más alejados del animal (Liebisch y Liebisch, 2008)) y formulaciones de inmersión (en que se sumerge al animal en una solución insecticida) y en sistémicas inyectables (basadas normalmente en lactonas macrocíclicas como las avermectinas), que matan al insecto después de que este ingiera sangre de los animales tratados.

Las formulaciones *pour-on*, de inmersión y los crotales están basados en la utilización de PSs u OFs. Estos compuestos insecticidas ejercen su efecto de dos maneras, en primer lugar son altamente tóxicos para los insectos que se posan sobre un animal tratado, a menudo matándolo en pocos minutos, en segundo lugar ejercen también irritación por contacto que reduce la posibilidad de que el insecto inicie o complete el ciclo de alimentación sobre el hospedador.

La deltametrina es un insecticida sintético basado estructuralmente en piretrinas naturales que paraliza rápidamente el sistema nervioso del insecto. Estudios pilotos realizados sobre la eficacia de la deltametrina han demostrado que este compuesto es activo en los *Culicoides* adultos (Mehlhorn *et al.*, 2008c). La eficacia de este insecticida depende, sin embargo, de la formulación del compuesto final, por lo que es necesario determinar si los *Culicoides* son sensibles a la deltametrina en las formulaciones de los productos comerciales a aplicar sobre los animales. Además, los productos aplicados deben llegar en la suficiente cantidad a las patas y a lo largo del vientre de los animales tratados, ya que los sitios que queden sin tratar podrían ser el objetivo de las picaduras de estos insectos (Nielsen *et al.*, 1988; Stendel *et al.*, 1992).

*5.3 Determinación de la sensibilidad
de Culicoides spp. adultos a la
Deltametrina mediante la utilización
de cámaras de ensayo de la OMS**

** Este apartado se ha enviado a publicar. Se puede encontrar la copia en inglés en el
Anexo 9.3*

5.3.1 INTRODUCCIÓN

La finalidad del presente ensayo fue la de analizar la sensibilidad de distintas especies de *Culicoides* presentes en Mallorca a la deltametrina. Se ha utilizado el ensayo desarrollado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para detectar la resistencia del mosquito *Anopheles* (vector del paludismo) a insecticidas organoclorados, organofosforados y carbamatos. El ensayo original fue modificado en el presente estudio para determinar la sensibilidad de los *Culicoides* a la deltametrina y fue realizado en colaboración con los equipos participantes en el proyecto europeo MedReoNet.

A partir de los resultados obtenidos se puede obtener información importante para el diseño de fórmulas comerciales, con una concentración de deltametrina determinada, capaces de ejercer un control eficaz en las poblaciones de *Culicoides*. Los ensayos con poblaciones de la misma especie en distintos países ayudarían a reflejar la variedad genética y/o ambiental que presenta una especie concreta a la susceptibilidad de un determinado insecticida.

5.3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

Localización

La captura de adultos de *Culicoides* spp. se realizó en una granja dedicada a la producción láctea localizada en el término municipal de Felanitx (C'as Boter: 39° 30' N; 3° 7' S, Mallorca, España). Dicha explotación se escogió debido al gran número de *Culicoides* que habitualmente se encuentran en esta zona.

Captura de Culicoides

Se realizó mediante trampas de luz U.V. del tipo Onderstepoort (ARC-OVI, Pretoria, Sudáfrica) y mini-CDC (John Hock Company, Gainesville, FL, EE.UU.) que se encendieron desde el anochecer (19:30 pm) hasta el amanecer (07:00 am) durante un número determinado de noches entre abril y junio de 2010.

En el interior de los botes de recogida de los insectos se colocó un papel arrugado para protegerlos de la corriente de aire generada por el ventilador de la trampa. A primera hora de la mañana siguiente se recogieron los insectos capturados y se llevaron rápidamente al insectario del laboratorio para evitar su deshidratación.

Los *Culicoides* capturados se separaron en grupos de aproximadamente 100 individuos y se alimentaron con un algodón embebido en una solución de sacarosa al 5%. Los insectos se mantuvieron durante 24 horas en condiciones de oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 75-85% H.R. antes de llevar a cabo el ensayo.

Bioensayo

Los bioensayos se realizaron según el procedimiento de la OMS con distintas especies de *Culicoides* (Barnard, 2005). Estos ensayos consisten en la utilización de cilindros de plástico en los que se han introducido papeles impregnados con una concentración de insecticida conocida para ensayar la susceptibilidad de los insectos a estudiar. Para estandarizar la edad de los insectos ensayados solo se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos a partir de hembras nulíparas.

Los papeles utilizados en el ensayo fueron suministrados por la Unidad de Investigación de Control de Vectores de la Universidad Sains en Malasia (Centro colaborador de la OMS) y consistieron en papeles de filtro (Whatman nº 1, 90 g/m^2 , 12 x 25 cm), impregnados con insecticida mediante una mezcla de acetona-silicona como solvente (2ml por papel, 67% acetona y 33% silicona). También fueron suministrados papeles control impregnados únicamente con 2 ml de mezcla acetona-silicona (WHO, 1981).



Figura 22. Batería de ensayo de cinco concentraciones de deltametrina (0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005 y 0.01%) (puntos rojos) más el control (punto verde)

Durante los ensayos, se expusieron grupos de ≈ 100 *Culicoides* de distintas especies a papeles impregnados con deltametrina en el interior de tubos estándar de la OMS a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 75-85% H.R. Los insectos fueron expuestos a diferentes concentraciones de deltametrina (0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005 y 0.01%) y al papel control durante una hora y se contabilizó el número de individuos muertos por la acción inmediata del insecticida (Fig. 22). Después de la exposición, los insectos supervivientes a la acción de choque del insecticida se transfirieron a tubos limpios y se alimentaron mediante un algodón embebido en una solución de sacarosa al 5% (Fig. 23). Los *Culicoides* ensayados y control se dejaron en oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 75-85% H.R. durante 24 horas, después de las cuales se registró nuevamente la mortalidad y se determinaron las especies supervivientes y las afectadas por el insecticida, así como su estado gonotrófico. Cuando la mortalidad en los individuos control se situó entre el 5 y el 20%, los resultados obtenidos se corrigieron mediante la aplicación de la fórmula de Abbot, que tiene en cuenta la proporción de insectos que mueren en un ensayo de toxicidad incluso cuando estos no han sido expuestos a la toxina. Si la mortalidad control era superior al 20% los resultados de ese ensayo fueron desestimados.

Al finalizar el ensayo, los papeles impregnados se conservaron a -20°C . Todo el material utilizado se limpió mediante su inmersión en una solución alcalina de hidróxido de sodio (Derquim LA 15) durante al menos 24 horas después de cada ensayo. El material con insecticida fue lavado aparte.

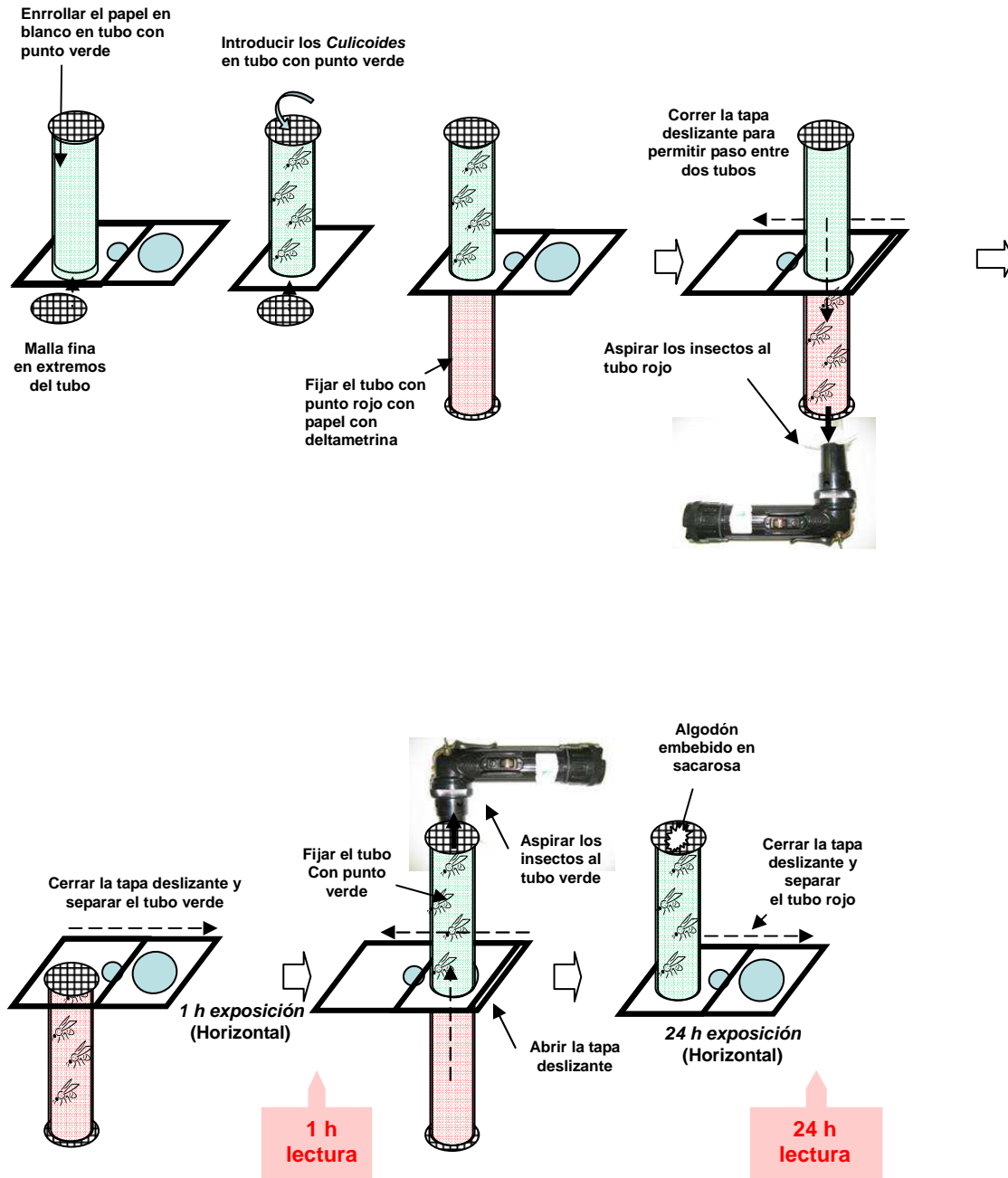


Figura 23. Protocolo para determinar la sensibilidad de *Culicoides spp.* a la deltametrina utilizando las cámaras de la OMS (Adaptado de Venail y col. 2009)

Análisis de resultados

Todos los datos se sometieron a un análisis Probit (Finney, 1971) mediante el programa XLStat 2011 (Addinsoft) con intervalos de confianza del 95% y se establecieron la DL₅₀ y DL₉₀ (Raymond, 1985). Si el porcentaje acumulativo de la mortalidad se transforma en unidades probit y se relaciona con el logaritmo de la dosis del agente tóxico, se obtiene una línea logaritmo de la dosis/mortalidad probit (LD-P). Mediante el análisis Probit de los datos dosis-mortalidad es posible caracterizar la respuesta de una población a un tóxico y establecer la dosis del insecticida necesaria para eliminar un porcentaje determinado de individuos tratados (Ferrari *et al.*, 1996). Los intervalos de confianza de DL₅₀ y DL₉₀ pueden ser utilizados para la comparación de diversos grupos de tratamiento. La pendiente de la línea LD-P es una medida de la variabilidad del grupo. A mayor pendiente, más uniforme es la respuesta de los individuos a la concentración del insecticida.

5.3.3 RESULTADOS

Se ensayaron un total de 2737 *Culicoides* pertenecientes a diez especies distintas (Complejo Obsoletus, *C. circumscriptus*, *C. newsteadi*, *C. maritimus*, *C. univittatus*, *C. cataneii*, *C. longipennis* (Khalaf 1957), *C. pictipennis* (Staeger 1839), *C. puncticollis* (Becker 1903) y *C. imicola*). Los insectos se repartieron en grupos de entre 72.7 ± 30.7 y 114 ± 38.2 individuos por test, en réplicas de tres a siete, según concentración de insecticida utilizada (Tabla 8).

La mortalidad natural media en las pruebas control durante las 24 horas que duraron los ensayos fue del $7.4 \pm 7.6\%$. Los valores de mortalidad natural fueron tomados como referencia para corregir las mortalidades observadas a distintas concentraciones del insecticida mediante la aplicación de la fórmula de Abbot (Finney, 1949).

Las medias de los porcentajes de mortalidad después de una hora de exposición al insecticida se situó entre el $22.25 \pm 16.8\%$ para una dosis de deltametrina del 0.0001% y el $100 \pm 0\%$ para las concentraciones de deltametrina del 0.005 y 0.01% (Tabla 8). El porcentaje de mortalidad obtenido a las 24 horas del ensayo se situó entre el $41.9 \pm 18.4\%$ para la menor concentración ensayada (0.0001%) y el $100 \pm 0\%$ para las dosis más

concentradas del insecticida (0.005 y 0.01%) (Tabla 8). Las dosis más concentradas (0.005% y 0.01%) se ensayaron únicamente tres veces ya que se obtenía invariablemente una mortalidad del 100%. Para las demás concentraciones, en las que podía observarse un porcentaje de supervivencia se realizaron seis (0.001%) o siete (0.0005 y 0.0001) réplicas (Tabla 8).

Tabla 8. Concentraciones de deltametrina utilizadas en el ensayo. Número de individuos ensayados con sus medias y desviaciones estándar (DE) y porcentajes de mortalidad obtenidos a la hora y a las 24h con sus correspondientes desviaciones estándar.

Concentración Deltametrina (%)	Σ individuos ensayados	N	$\bar{X} \pm DE$	$\bar{X} \% \text{ mort} \pm DE$ (1h)	$\bar{X} \% \text{ mort} \pm DE$ (24h)
Control	485	7	69.3 \pm 14.4	2.15 \pm 3.8	7.4 \pm 7.6
0.0001	525	7	75 \pm 46.2	22.25 \pm 16.8	41.9 \pm 18,4
0.0005	798	7	114 \pm 38.2	79.8 \pm 22.5	83.1 \pm 17.8
0.001	489	6	81.5 \pm 27.1	93.8 \pm 8.1	94.8 \pm 5.2
0.005	218	3	72.7 \pm 30.7	100 \pm 0	100 \pm 0
0.01	222	3	74 \pm 32.5	100 \pm 0	100 \pm 0

Los resultados de mortalidad obtenidos después de realizar correcciones mediante la fórmula de Abbot indicaron que la dosis letal 50 (DL_{50}) corresponde a una concentración de deltametrina del 0,000145%, y que la concentración de insecticida necesaria para eliminar un 90% de la población (DL_{90}) de estos insectos fue del 0,000576% (Fig. 24).

Los índices de mortalidad del complejo *Obsoletus* fueron similares a los observados en la población total. Para estas especies se obtuvo una $DL_{50} = 0.000174$ y una $DL_{90} = 0.000576$. No se observaron diferencias significativas en la mortalidad del Complejo *Obsoletus* comparado con la mortalidad de la población total de *Culicoides* ensayada.

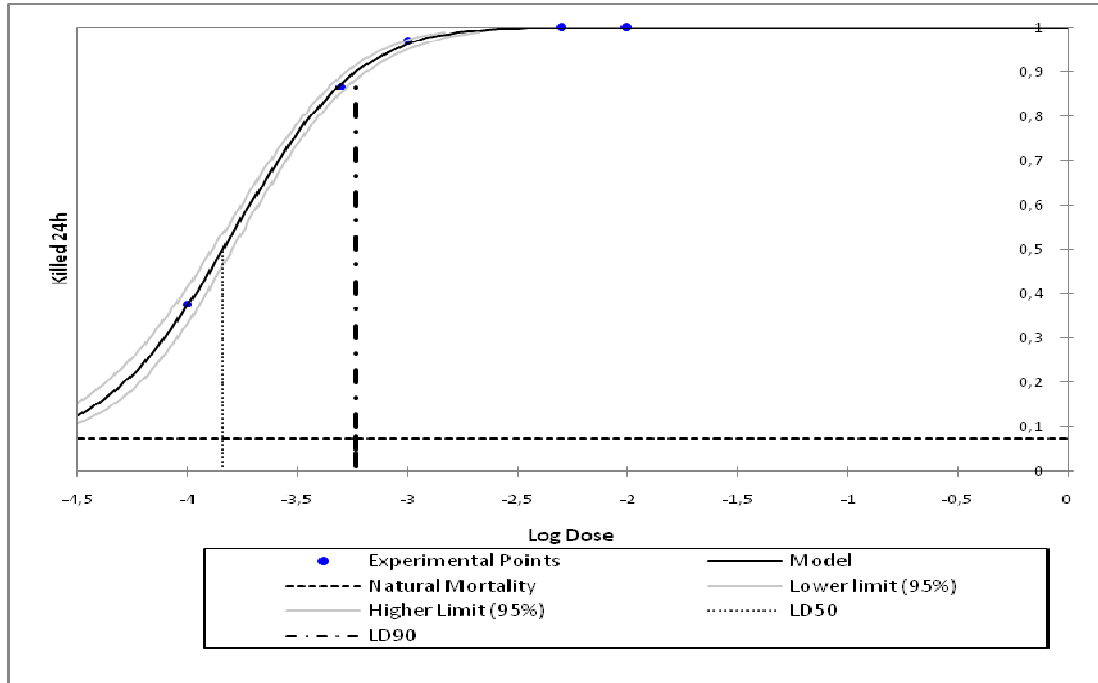


Figura 24. Modelo de distribución de individuos muertos según dosis. Se muestran los resultados de mortalidad de los ensayos y el modelo de distribución que se ajusta a la dispersión de los datos con sus intervalos de confianza del 95%. En el eje X se representa el log de la dosis utilizada y en el eje Y la mortalidad a las 24h post-exposición en tanto por uno. Se indican las DL_{50} y DL_{90} .

La pendiente observada en la línea LogDosis-Probit (Ld-P) mostró homogeneidad de la población en respuesta al tratamiento insecticida ($p = 2.11$; $R^2 = 0.96$). La disposición de la línea Ld-P indica una respuesta unimodal de la población de *Culicoides* al tratamiento (Fig. 25).

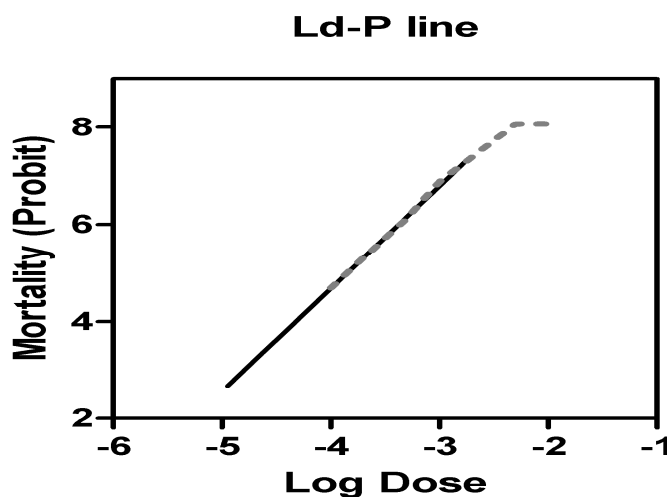


Figura 25. Línea LogDosis-Probit (Ld-P) de la población de *Culicoides* ensayada. La línea punteada (gris) representa los puntos experimentales, mientras que la línea continua (negra) representa la línea de regresión (Ld-P)

Las especies ensayadas en el presente estudio junto con sus porcentajes relativos al número de *Culicoides* totales fueron las siguientes: especies del complejo *Obsoletus* (78.4%), *C. circumscriptus* (15.12%), *C. newsteadi* (3.65%), *C. maritimus* (0.86%), *C. univittatus* (0.82%), *C. cataneii* (0.58%), *C. longipennis* (0.27%), *C. pictipennis* (0.1%), *C. puncticollis* (0.1%) y *C. imicola* (0.07%). De los 2904 *Culicoides* ensayados, 2277 pertenecían al complejo de especies *Obsoletus*. De estos, un total de 793 fueron enviados al centro de investigación CIRAD (Francia) para su determinación específica mediante análisis molecular de PCR. Los resultados de los análisis moleculares indicaron que tan solo 5 individuos del total analizado pertenecían a la especie *C. scoticus* (0.63%), mientras que el resto (788 individuos; 99.37%) pertenecían a la especie *C. obsoletus*.

5.3.4 DISCUSIÓN

Las distintas especies de *Culicoides* ensayadas en laboratorio han demostrado una elevada sensibilidad a la deltametrina. La menor concentración utilizada (0.0001%) fue suficiente como para provocar un descenso significativo en la supervivencia de las poblaciones de *Culicoides* (\approx 40% mortalidad). Para dosis mayores del 0.005% la mortalidad en el estudio fue invariablemente del 100%. En este trabajo se demuestra por tanto que las poblaciones de *Culicoides* ensayadas son susceptibles a la deltametrina en condiciones de laboratorio. Los resultados obtenidos apoyan otros ensayos realizados con productos comerciales que incluían deltametrina en su formulación (Mehlhorn *et al.*, 2008b; Schmahl *et al.*, 2008) en los que se demostraba la eficiencia de este piretroide en la eliminación de las especies de *Culicoides* que entraban en contacto con él.

El análisis Probit (Finney, 1971) se utiliza para caracterizar la respuesta de una especie a un compuesto tóxico y establecer la dosis de insecticida necesaria para matar un determinado porcentaje de individuos (Ferrari *et al.*, 1996). Las especies ensayadas se caracterizan por las concentraciones de insecticida que matan el 50% (DL₅₀) y el 90% (DL₉₀) de la población de los individuos tratados. Las DL₅₀ y DL₉₀ pueden ser utilizadas para comparar la sensibilidad entre especies o de las distintas poblaciones de una misma especie. La DL₅₀ obtenida en el presente bioensayo fue de 0.000145% y la DL₉₀= 0.000579% (Fig. 24) para la población total y DL₅₀ = 0.000174; DL₉₀ = 0.000576% para

el complejo *Obsoletus*. Venail y col. obtuvieron a partir de poblaciones del complejo *Obsoletus* capturadas en el campo una $DL_{90} = 0.00203\%$ a las 24h post tratamiento con deltametrina (Venail *et al.*, 2011). Las poblaciones del complejo *Obsoletus* ensayadas en el presente trabajo fueron 3.5 veces más susceptibles a la deltametrina que las ensayadas por Venail y col. Esto indica que una misma especie de *Culicoides* (así como las distintas especies) puede presentar sensibilidades distintas a un mismo insecticida dependiendo de sus adaptaciones ambientales.

Si el porcentaje de mortalidad acumulada se transforma en unidades probit y se representa contra el logaritmo de las dosis del compuesto tóxico se obtiene la línea LogDosis-Probit (Ld-P). La pendiente de la curva es una medida de la variabilidad de la población ensayada al insecticida. Cuanto mayor sea la pendiente, más uniforme será la respuesta de los individuos a la concentración insecticida. La pendiente obtenida en el presente ensayo ($p = 2.11$) refleja poca variación de respuesta al insecticida en los individuos ensayados. No se observaron fenómenos de tolerancia en los diferentes ensayos y la respuesta al insecticida fue uniforme tal como demuestra la línea de regresión en la Figura 25. Se desconoce el impacto que puede tener las prácticas agrícolas y ganaderas sobre las respuestas de las poblaciones de *Culicoides* a determinados insecticidas. Para prevenir la aparición de resistencias a un insecticida determinado se recomienda la utilización alternada de la deltametrina con otros insecticidas como la permetrina, el fenvalerato o la ciflutrina ya que han demostrado los mismos efectos tóxicos que la deltametrina cuando se aplican en espray o en formulaciones *pour-on* (Mehlhorn *et al.*, 2008; Mehlhorn *et al.*, 2008c; Schmahl *et al.*, 2009; Schmahl *et al.*, 2008).

En estudios de campo, se han detectado efectos de tolerancia a la deltametrina para ciertas especies de *Culicoides* (*C. imicola* y *C. obsoletus*) que habían demostrado sensibilidad en ensayos de laboratorio (Venail *et al.*, 2011; Bauer *et al.*, 2009). La causa de esta menor eficiencia en campo puede ser la heterogénea distribución del insecticida en los animales tratados, en donde ciertas partes de estos, como por ejemplo las ubres o el hocico, pueden quedar sin proteger, especialmente en las aplicaciones con formulaciones tipo *pour-on* (Mullens *et al.*, 2000; Carpenter *et al.*, 2007; Liebisch y Liebisch, 2008; Schmahl *et al.*, 2009) o con crotales. Las zonas sin cubrir por el insecticida pueden convertirse en los principales puntos de picaduras de los animales tratados (Nielsen *et al.*, 1988; Stendel *et*

al., 1992). Una manera de evitar problemas en la distribución de insecticidas es la aplicación subcutánea de ivermectinas (lactonas macrocíclicas) (Standfast *et al.*, 1984). Sin embargo, la aparición de trazas del insecticida en las deposiciones de los animales y el descubrimiento de nematodos con múltiples resistencias a las avermectinas en animales tratados ponen en duda la conveniencia del uso de este tratamiento (Strong, 1992). Otros estudios realizados por Holbrook y Mullens indican que estos compuestos no afectan la supervivencia de *C. variipennis* cuando son inyectadas vía subcutánea a las dosis recomendadas (Holbrook y Mullens, 1994). Existen también tratamientos de inmersión, en donde todo el animal es introducido en una solución insecticida. Sin embargo, debido a los posibles efectos perjudiciales en el ambiente y en la salud humana y animal (Jess *et al.*, 2007) no son, por el momento, considerados como candidatos probables para ser aprobados por la legislación europea. Las aplicaciones de insecticida en espray pueden evitar los problemas de distribución sobre el cuerpo del animal, pero requiere la aplicación individual y un homogéneo reparto manual por parte del ganadero. En este sentido, la utilización de las mallas insecticidas ofrece una alternativa sencilla de tratamiento para controlar las poblaciones de *Culicoides*, aunque su eficacia en condiciones de campo está aun por demostrar (*ver apartado 5.5 del presente trabajo*). Por los motivos mencionados y a pesar del rápido efecto y elevada tasa de mortalidad que ofrecen los tratamientos con piretroides, no es común que la protección de los animales mediante tratamientos insecticidas sea del 100% (Tiawsirisup *et al.*, 2007). En cualquier caso, cada picadura que se evite prevendrá la posible transmisión de la enfermedad, por lo que la aplicación de insecticidas es recomendable cuando se detectan brotes de LA en un área determinada.

El presente estudio se realizó a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. En estas condiciones los bioensayos con deltametrina deberían ofrecer resultados fiables (Hodjati y Curtis, 1999). Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que los piretroides presentan coeficientes de toxicidad negativos a temperaturas $>28^{\circ}\text{C}$ (menor toxicidad a mayor temperatura) (Hodjati y Curtis, 1999). En la estación estival, las temperaturas de muchos países del sur de Europa a menudo superan los 30°C durante la mayor parte del día. Por ello, los piretroides utilizados en campo pueden ofrecer una menor efectividad que los resultados obtenidos en condiciones de temperatura situadas entre los 22 y 28°C realizados en laboratorio. Por tanto, se hace necesario ensayar el insecticida a diferentes temperaturas

para determinar si existe una pérdida significativa de eficacia en sus compuestos activos a temperaturas elevadas (>28°C). De esta manera se conocerían las concentraciones letales necesarias para su aplicación en las condiciones estivales del sur de Europa y se podría evitar la continua utilización de dosis sub-letales de piretroides en campo, ya que esto puede conducir, en breve espacio de tiempo, a la aparición de resistencias (Jandowsky *et al.*, 2009)

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que las poblaciones de *Culicoides* ensayadas presentan una elevada susceptibilidad a la deltametrina sin observarse fenómenos de resistencia entre los individuos de las distintas especies. Sería deseable repetir el presente ensayo sobre poblaciones de *C. imicola* para determinar la efectividad del insecticida sobre este vector. Los productos comerciales actuales utilizados para el control de insectos no están pensados para *Culicoides* y por tanto se desconoce los insecticidas más eficaces y las dosis mínimas necesarias para determinar si el insecticida tiene un impacto significativo sobre el control de la enfermedad de la LA. En futuros estudios deberían realizarse experiencias de campo en los que se ensayaran concentraciones letales de este piretroide (> 0.001%) mediante un método de aplicación efectivo en animales (ej. espray) o mediante la utilización de mallas tratadas con deltametrina (*ver apartado 5.5 del presente trabajo*) de manera que quedara demostrada la eficacia del este insecticida en condiciones de campo.

5.4 Estudio de la sensibilidad de
Culicoides spp. a mallas
impregnadas con Deltametrina
mediante la utilización de cámaras
de ensayo de la OMS

5.4.1 MATERIAL Y MÉTODOS

Insectos

Los insectos fueron capturados con trampas de luz U.V. tipo Onderstepoort y mini-CDC, en la misma finca que en el estudio anterior (C'as Boter: 39° 30' N; 3° 7' S, Mallorca, España), durante el periodo comprendido entre el 15/06/2011 y el 17/07/2011. Para la captura de los insectos vivos se tomaron las mismas precauciones que en el ensayo anterior (pág. 110; Captura de *Culicoides*). La separación de los *Culicoides* del resto de insectos se realizó en laboratorio introduciendo entre 30 y 100 *Culicoides* por tubo de ensayo de la OMS cerrado por cada uno de los lados con una malla fina. La alimentación de los insectos se realizó mediante un algodón embebido en una solución de sacarosa al 5%. Los *Culicoides* capturados se aclimataron a las condiciones de laboratorio (25°C ± 2°C y 75% H.R. en oscuridad) durante un periodo de 12-24 horas antes de la realización del ensayo.

Mallas con deltametrina

Para el presente ensayo se utilizaron mallas de polietileno impregnadas con deltametrina a una concentración de 4.4g/kg ± 15%. Estas mallas son de uso comercial (ZeroVector[®] Durable Lining, Asociación Dart) y se utilizan actualmente para controlar poblaciones de culícidos transmisores de malaria, fiebre amarilla y dengue en zonas endémicas. El insecticida es activo en las mallas durante 3 y 5 años, a partir de entonces se hace necesaria la sustitución de estas para ejercer un control efectivo sobre la población de mosquitos o insectos diana. Sin embargo, estas mallas no se han evaluado nunca frente a individuos de *Culicoides* spp.

Cámaras de la OMS con deltametrina

Para ensayar la eficacia que las mallas impregnadas con deltametrina tienen sobre las poblaciones de *Culicoides* se forraron tubos de la OMS por su interior con piezas de estas mallas (12 x 25 cm). Los *Culicoides* capturados se transfirieron a los tubos con

insecticida y este se colocó en posición horizontal de manera que se favoreciera el contacto de los insectos con las mallas durante el tiempo de exposición. Los insectos se mantuvieron en el interior de los tubos con deltametrina durante periodos de tiempo cada vez más cortos, hasta poder determinar el tiempo mínimo tiempo necesario con el que se conseguía un nivel de mortalidad elevado.

Debido a la duración del proceso de transferencia de los *Culicoides* de un tubo al otro (5-10 segundos), es difícil determinar el periodo exacto en que los insectos están en contacto con las mallas para tiempos de exposición bajos. Por este motivo, para tiempos de exposición inferiores a 30 segundos se procedió a anestésiar los *Culicoides* someténdolos a bajas temperaturas (-20°C) durante 2-3 minutos. Una vez anestésiados, los insectos se pusieron en contacto con las mallas durante periodos de 10, 20 o 30 segundos.

Después de los correspondientes periodos de exposición, los insectos se transfirieron de nuevo al tubo inicial sin deltametrina (los anestésiados aún sin despertar), y se determinó el tiempo transcurrido hasta observar una respuesta clara al insecticida.

5.4.2 RESULTADOS

Un total de 1382 *Culicoides*, representando nueve especies (*C. obsoletus* (Meigen 1918) (56.5%), *C. cataneii* (Clastrier 1957) (10.7%), *C. maritimus* (Kieffer 1924) (0.6%), *C. circumscriptus* (Kieffer 1918) (18.5%), *C. paolae* (Boorman, Mellor y Scaramozzino 1996) (7.7%), *C. newsteadi* (Austen 1921) (2.0%), *C. jumineri* (Callot y Kremer 1969) (1.1%), *C. nubeculosus* (Meigen 1830) (0.1%) y *C. punticollis* (Becker 1903) (2.7%)) fueron expuestos a las mallas durante periodos de tiempo cada vez menores hasta encontrar tasas de supervivencia en los insectos.

El número de réplicas realizadas para cada tiempo de exposición no fue el mismo. En periodos de exposición de 30 segundos se realizó un mayor número de réplicas (12) para determinar si se obtenían porcentajes de supervivencia de los insectos. Sin embargo, en la transferencia directa, la mortalidad de los *Culicoides* obtenida después del menor tiempo de exposición al insecticida fue del 100% (Tabla 9).

Los tiempos a los que se expusieron los *Culicoides* y los porcentajes de mortalidad están representados en la Tabla 9.

Tabla 9. *Tiempos de exposición a los que se sometieron los ejemplares de Culicoides spp. N° de individuos que sobrevivieron y murieron en el ensayo control. Número de réplicas realizadas para cada tiempo de exposición (N) y media más desviación estándar de los individuos vivos y muertos después de la exposición insecticida. Porcentaje de eficacia insecticida de la deltametrina en las mallas a los 6 y a los 40 minutos.*

	Tiempo Exposición	Control			Ensayo Insecticida			
		N° <i>Culicoides</i>			$\bar{X} \pm D.E.$		% mortalidad	
		Vivos	Muertos	N	Vivos	Muertos	6 minutos*	40 minutos
Transferencia directa	6 min	19	0	2	0	22 ± 2	100	100
	2 min	13	0	2	0	31,5 ± 13,5	100	100
	1 min	15	0	3	0	26,7 ± 1,7	73,7	100
	0,5 min	85	0	12	0	38,5 ± 12,6	83,7	100
Anestesiados	30 seg	52	0	3	2,7 ± 3,0	33,3 ± 12,2	0	92,6
	20 seg	33	0	3	2 ± 2,2	48 ± 14,7	0	96
	10 seg	27	0	5	3,6 ± 3,0	46,8 ± 12,3	0	92,8

*Tiempo a partir del cual se observaron síntomas de intoxicación

Transferencia directa de Culicoides

La tasa de mortalidad en los individuos expuestos a las mallas impregnadas con deltametrina fue del 100% independientemente del tiempo de exposición ensayado. El tiempo transcurrido en que los insectos murieron después de la exposición a la deltametrina varió entre 6-17 minutos independientemente del tiempo de exposición. Tanto en el caso de exposiciones cortas al insecticida (30 segundos) como de exposiciones largas (6 minutos), se detectaron claros síntomas de intoxicación por el insecticida en la mayor parte de los individuos a partir de los 6 minutos post-exposición (Tabla 9). A partir de ese momento, entre el 73.7 y el 100% de los *Culicoides* había muerto o presentaban dificultad en caminar o volar, mientras que el resto de la población seguía en condiciones aparentemente normales. A partir de los 9-17 minutos, toda la población expuesta al insecticida había muerto o estaba lo suficientemente afectada sin poder volar o caminar con normalidad.

*Contacto con las mallas después de anestésiar *Culicoides* por frío*

Para tiempos inferiores a 30 segundos se procedió a anestésiar los *Culicoides* sometiéndolos a bajas temperaturas (-20°C) durante 2-3 minutos antes de ponerlos en contacto con las mallas. Para tiempos de exposición de 30 segundos se comparó la eficacia del insecticida en *Culicoides* transferidos directamente y en aquellos que eran anestésiados previa exposición. El 100% de los *Culicoides* anestésiados despertaban en un tiempo comprendido entre los 30 y 60 segundos después de haber estado en contacto con las mallas.

El porcentaje de mortalidad en insectos anestésiados tras el contacto con las mallas durante 30, 20 y 10 segundos fue del 92.8%, 96% y 92.6% respectivamente (Tabla 9). El tiempo necesario para observar síntomas claros de intoxicación en la población de insectos ensayados fue sensiblemente mayor en insectos anestésiados (40 minutos) que en aquellos transferidos directamente (6 minutos).

5.4.3 DISCUSIÓN

El presente estudio es el primero que analiza el efecto de las mallas insecticidas en laboratorio sobre poblaciones de vectores responsables de transmisión de la enfermedad de la LA. En el presente estudio se observó que el contacto con las mallas insecticidas tuvo un claro efecto sobre las poblaciones de *Culicoides* ensayadas. Los porcentajes de mortalidad llegaron a ser del 100% para los insectos transferidos directamente a las mallas y > 90% en los casos en que se anestésió a los *Culicoides* antes de su exposición al insecticida. Los porcentajes de mortalidad observados en los *Culicoides* anestésiados no llegaron a ser del 100% y estos tardaron más tiempo en demostrar efectos claros de intoxicación al insecticida (40 minutos) que los *Culicoides* transferidos directamente (6 minutos). Al anestésiar e inmovilizar los insectos se evita que estos puedan caminar por las mallas, por tanto, el número de puntos de contacto insecticida-insecto es menor que en el caso de que tengan libertad para volar, caminar y adentrarse entre los fibras de las mallas. Además, al encontrarse anestésiados, los *Culicoides* tienen una menor actividad metabólica y por tanto menor demanda de oxígeno a través de sus espiráculos

respiratorios que podrían encontrarse parcialmente cerrados. La inhalación de insecticida será en este caso menor que cuando los *Culicoides* están activos. Estos hechos son, posiblemente, los responsables de que se necesite periodos de tiempo más prolongados de exposición a las mallas en *Culicoides* anestesiados que en *Culicoides* transferidos directamente. La distinta respuesta de los *Culicoides* se puede observar al comparar los dos métodos en tiempos de exposición al insecticida de 30 segundos (Tabla 9). Estos datos permiten comparar las dos técnicas utilizadas para evaluar la eficacia insecticida de las mallas y muestran que el insecticida penetra con mayor eficiencia en el insecto cuando este está activo, moviéndose e intercambiando oxígeno a una tasa superior que cuando está inactivo. Este último caso sería el más realista ya que supondría la situación natural en que *Culicoides* silvestres entran en contacto con mallas insecticidas instaladas sobre las paredes de las zonas de reposo de animales estabulados y que se intoxican de manera letal tras una exposición de tan solo 30 segundos. La exposición de medio minuto al insecticida es suficiente para eliminar eficazmente al 100% de los *Culicoides* que entran en contacto con las mallas. Sin embargo, según los resultados obtenidos, tiempos de exposición menores serían igualmente eficaces para el control de estos dípteros. Para exposiciones de 30 y 10 segundos al insecticida después de anestésiar a los *Culicoides*, el porcentaje de mortalidad después de 40 minutos fue del 92.8% y 92.6% respectivamente (Tabla 9). En base a los resultados obtenidos, es posible extrapolar que se puedan obtener porcentajes de mortalidad del 100% en un corto periodo de tiempo (15 minutos), en situaciones naturales en que *Culicoides* silvestres entren en contacto con las mallas durante periodos de tiempo de tan solo 10 segundos. Existen ensayos de laboratorio realizados con túneles de viento que han determinado la mortalidad de *Culicoides* adultos expuestos a distintos insecticidas y que demuestran que la eficacia de los piretroides sintéticos (PSs) es superior al de los productos OFs (Kline y Roberts, 1981; Floore, 1985). Por este motivo, la utilización de piretroides para la lucha contra plagas se recomienda preferentemente antes que la utilización de OFs.

Distintas mallas tratadas con insecticidas han demostrado su efectividad sobre toda una serie de artrópodos perjudiciales (múscidos, tabánidos, culícidos, etc.) para el hombre o el ganado (Maia, 2009), pero su efecto nunca había sido comprobado en laboratorio sobre las poblaciones de *Culicoides*. En estudios de campo con mallas impregnadas con deltametrina (100 mg/m²) colocadas en establos se comprobó que, si bien el número total

de individuos capturados en trampas de luz no se vio reducido, sí que lo hizo el número de *Culicoides* alimentados comparados con establos control (Rohrmann, 2010). Sin embargo, en el citado estudio también se detectó un incremento en la tolerancia a la deltametrina mediante la evaluación del TL-50 (tiempo que se tarda en paralizar al 50% de la población) debido probablemente a la degradación de las mallas (Rohrmann, 2010). En cuanto a los impactos del uso de esta técnica en el interior de los establos, análisis ecotoxicológicos no detectaron restos de deltametrina en la leche de los animales analizados ni en el agua recogida, sin embargo, sí se detectaron pequeñas dosis del insecticida en muestras de suelo (Frenzel, 2008). Otros estudios de campo han determinado la efectividad de productos organofosforados (OFs) mediante la impregnación de mallas con propoxur o malatión (6% p/v disuelto en 80% etil-etanol). Estas mallas provocaron un rápido efecto sobre los *Culicoides* expuestos (<1h) y una mortalidad del 100% de la población durante 27 días incluso cuando las mallas estaban expuestas en el exterior (Jamnback, 1963). Sin embargo, la utilización de mallas impregnadas con piretroides como la deltametrina pueden ofrecer mejores resultados que los productos OFs, ya que la duración del insecticida residual es mayor, a la vez que no poseen los efectos nocivos de estos (alta toxicidad en organismos no plaga y mamíferos; resistencias).

En estudios realizados en el suroeste de España con corrales construidos mediante barreras físicas (lonas), no se consiguió evitar la entrada de especies vectoras (como *C. imicola*) ni el contacto con los animales, mientras que si se trataban estas barreras con insecticida (0.5 g/l de cipermetrina) se prevenía el contacto del vector con los animales. (Calvete *et al.*, 2010). En este sentido, para el control de especies exofílicas de *Culicoides*, la utilización de mallas insecticidas en el exterior de los establos y zonas de descanso de los animales no evitaría completamente el contacto de estos insectos con los animales. Sin embargo, sí podrían reducir de manera sensible el número de *Culicoides* que consiguen alimentarse sobre los animales, reduciendo así las probabilidades de infección.

En el caso de tener los animales estabulados y querer ofrecer protección frente a las picaduras de especies de *Culicoides* preferentemente endofílicas se debe tener en cuenta que la instalación de las mallas en ventanas o lugares de ventilación de los establos no es aconsejable debido a que se reduce la entrada de luz en las estancias y, en caso de que se instalen mallas con diámetro de paso lo suficientemente pequeño como para evitar la

entrada de estos pequeños dípteros (1-3 mm), se compromete la aireación en las zonas de descanso de los animales, perjudicando su bienestar como se ha sugerido por Meiswinkel y col. (2000). Además, en ensayos de campo con mallas tratadas con deltametrina (100 mg/m²) colocadas en el exterior de establos, las capturas de *Culicoides* obtenidas mediante trampas de luz no se vieron reducidas (Bauer *et al.*, 2009). Por ello, en nuestra opinión, para evitar problemas en la salud de los animales estabulados, la instalación de mallas tratadas con insecticida debería realizarse sobre las paredes de los establos, de manera que estas puedan ejercer su efecto sobre los *Culicoides* cuando estos acuden a ellas para descansar. De esta manera, se puede conseguir una disminución de las poblaciones de vectores que se alimentan sobre los animales en el interior de estas instalaciones, ya que según los resultados de nuestro estudio, las mallas tratadas con deltametrina han demostrado ser altamente eficaces en la eliminación de *Culicoides*. Esta sería una medida a tener en cuenta en los países donde el vector principal del VLA se considera básicamente endofílico, como es el caso de *C. obsoletus* en el norte de Europa. Para aquellos vectores considerados principalmente exofílicos, como *C. imicola*, (aunque se ha observado que esta especie presenta también un comportamiento endofílico (Calvete *et al.*, 2009)) la utilización de mallas con insecticida para evitar la transmisión del virus tendría posiblemente una eficiencia más limitada. En todo caso, debería de combinarse con otras medidas profilácticas de control (aplicación de insecticidas sobre los animales, estabulación nocturna, desecación de los posibles lugares de cría cercanos, etc.), salvo en el caso en que los animales se mantuvieran en corrales exteriores rodeados por malla insecticida de manera que se consiguiera disminuir la presión de picaduras sobre los animales.

Por otro lado, la utilización de mallas tratadas con insecticidas podría ser de gran utilidad en el transporte de animales, debido a que pueden reducir de manera eficaz las infecciones con el VLA en el interior de los vehículos utilizados para el desplazamiento del ganado (Doherty *et al.*, 2004).

El presente ensayo demuestra que las mallas ensayadas provocan una elevada y rápida mortalidad en los *Culicoides*. Una vez comprobada la efectividad de las mallas en ensayos de laboratorio es necesario verificar la disminución de las poblaciones de vectores en ensayos de campo para determinar su utilidad en el control de la enfermedad de la LA.

5.5 Evaluación de la eficacia en
condiciones de campo de mallas
tratadas con deltametrina en el
control de Culicoides spp.

5.5.1 MATERIAL Y MÉTODOS

Emplazamiento

El siguiente estudio se llevó a cabo en una finca situada en el término municipal de Campos (39° N 3° E; Ca Sa Manescala, Mallorca) dedicada a la compra y venta de caballos para consumo. Se realizó un ensayo durante 12 noches comprendidas entre el 12 y el 28/10/2011. Las capturas de una trampa de luz instalada previamente revelaron la presencia de varias especies de *Culicoides* entre las que se incluía *C. imicola*, siendo uno de los motivos por los cuales se decidió realizar el estudio en dicha finca. Durante el periodo que duró la prueba se registraron los datos climatológicos de una estación cercana a la finca y se observó que la temperatura ambiental osciló entre los 12°C de mínima y los 26°C de máxima.

Material del ensayo

Para el presente ensayo se utilizaron las mismas mallas de polietileno impregnadas con deltametrina que las que se utilizaron para el estudio anterior (*ver apartado 5.4 del presente trabajo*). Para las pruebas de campo, las mallas se montaron sobre un enrejado metálico de 1.6 m de alto por 1 m de ancho que rodeaba una estructura de la que se sostenía una trampa del tipo Onderstepoort a una altura de 1.5 metros conectada a la corriente eléctrica. La parte superior del enrejado se cubrió igualmente, por lo que la trampa de luz quedaba rodeada completamente por malla (Fig. 26).

En la base de la estructura se colocó una tela de polietileno blanca, de manera que se pudieran aspirar los individuos muertos que quedaban en las inmediaciones de la trampa y poder evaluar el efecto de choque de las mallas sobre los *Culicoides* y otros insectos que pudieran ser relevantes (ej. enemigos naturales o endemismos).

Diseño experimental

- Capturas en trampas rodeadas de mallas impregnadas y mallas control

Las estructuras se ubicaron en el terreno, en un área rodeada por caballos (Fig. 26), de manera que los *Culicoides* de las inmediaciones fueran atraídos por las trampas. Las trampas se colocaron a una distancia de aproximadamente 10 m una de la otra, de tal manera que la luz de una no interfiriese con la de la otra. Las trampas se conectaban desde el anochecer (19.00 h) hasta el amanecer (08.00 h), momento en el que se recogían los *Culicoides* capturados para llevarlos al laboratorio, en donde se determinaba la especie y su estado gonotrófico. La tela de polietileno situada en la base de la estructura era aspirada en busca de insectos muertos que fueron llevados al laboratorio para su determinación.

Una vez recogidos los insectos, cada estructura se alternaba de sitio de con el fin de que cada una estuviera el mismo número de noches en cada uno de los emplazamientos escogidos y eliminar, de esta manera, las posibles variaciones debidas a efectos de situación.



Figura 26. Malla tratamiento montada sobre la estructura metálica y fijada al terreno en donde puede apreciarse la trampa Onderstepoort en su interior y la base blanca de polietileno

- Capturas en trampas sin malla

Durante cuatro noches se realizaron capturas de insectos en los emplazamientos seleccionados mediante las mismas trampas Onderstepoort pero sin rodearlas por las estructuras con las mallas. De esta manera se pretendía comparar los resultados de las capturas sin malla y con malla control para determinar si la presencia de las mallas sin tratar ofrecía algún tipo de protección frente a la entrada de *Culicoides* al interior de las estructuras.

- Capturas en trampas fuera de la zona de estudio

Se realizaron capturas de insectos mediante una trampa Onderstepoort situada fuera de la zona de estudio, pero en el interior de un establo exterior con equinos (caballos y burros), de manera que se pudiese contar con una referencia externa para monitorizar las variaciones diarias en el número de *Culicoides* de la zona.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante la comparación de varianzas con el paquete estadístico XLStat 2009.

Se analizaron las diferencias en las capturas totales de las trampas rodeadas de malla con y sin insecticida y la supervivencia de los *Culicoides* capturados en relación con las capturas totales de cada trampa. Se consideraron diferencias significativas de los distintos análisis para $P < 0.05$.

5.5.2 RESULTADOS

Se muestrearon un total de 11 noches con la trampa rodeada de malla control y 12 noches con la trampa rodeada con malla insecticida. Un fallo en el suministro eléctrico interrumpió la alimentación de la trampa control durante una de las noches de muestreo.

- Composición específica de las capturas

Durante el periodo de estudio se capturaron un total de 2344 *Culicoides* correspondientes a trece especies distintas: *C. imicola* (Kieffer 1913), Complejo *Obsoletus* (Meigen 1918), *C. circumscriptus* (Kieffer 1918), *C. cataneii* (Clastrier 1957), *C. longipennis* (Khalaf 1957), *C. newsteadi* (Austen 1921), *C. nubeculosus* (Meigen 1830), *C. maritimus* (Kieffer 1924), *C. paolae* (Boorman 1996), *C. pictipennis* (Staeger 1839), *C. univittatus* (Vimmer 1932), *C. parroti* (Kieffer 1922) y *C. jumineri* (Callot y Kremer 1969). Las especies más capturadas entre las mallas control y tratamiento fueron *C. circumscriptus* (31.3%) y *C. imicola* (31.6%). Las capturas de especies del complejo *Obsoletus* fueron del 4.1%.

- Comparación de capturas entre trampas tratamiento y control

La trampa envuelta con malla control capturó un total de 506 ejemplares, de los cuales 372 (73.5%) se recolectaron muertos en el interior de las trampas y 134 (26.5%) vivos. La trampa rodeada de malla con insecticida capturó un total de 313 individuos, de los cuales 265 (84.7%) se recolectaron muertos y 48 (15.3%) vivos. En lo que se refiere a las capturas de las especies con mayor importancia epidemiológica, en la trampa control un 31.2% de *C. imicola* se colectó muerto y un 26.9% vivo, mientras que en la trampa tratamiento se colectó un 39.2% muerto y un 33.3% vivo. En cuanto a las especies del complejo *Obsoletus*, el 5.9% se recogieron muertas y el 2.2% vivas en la trampa control, mientras que en la trampa tratamiento el 3.4% se colectaron muertas y el 2.1% vivas (Tabla 10).

El análisis de la varianza entre los ensayos tratamiento y control no mostró diferencias significativas en el número de individuos capturados por cada una de las trampas.

En cuanto al estado gonotrófico de las especies en la trampa control se capturaron principalmente hembras grávidas tanto muertas 65.1%, como vivas 80.6% (Tabla 11). En el caso de las especies vectoras de relevancia durante este periodo de estudio (octubre 2011) (*C. imicola*), también se capturaron en su mayoría hembras grávidas 71.6% (muertas) y 69.4% (vivas).

En la trampa tratamiento también dominaron las hembras grávidas tanto en las capturas totales 62.8% muertas y 72.0% vivas (Tabla 11) como teniendo en cuenta solo a *C. imicola* 67.3% muertas y 68.8% vivas.

Tabla 10. Composición del número total de Culicoides capturados en trampas control y tratamiento según especie junto con su porcentaje relativo del total de capturas.

Especie	Control				Tratamiento			
	Nº Muertos	%	Nº Vivos	%	Nº Muertos	%	Nº Vivos	%
<i>C. imicola</i>	116	31,2	36	26,9	104	39,2	16	33,3
Compl. Obs.	22	5,9	3	2,2	9	3,4	1	2,1
<i>C. circumscriptus</i>	120	32,3	59	44,0	65	24,5	26	54,2
<i>C. cataneii</i>	45	12,1	13	9,7	31	11,7	0	0,0
<i>C. longipennis</i>	3	0,8	0	0,0	4	1,5	0	0,0
<i>C. newsteadi</i>	21	5,6	6	4,5	16	6,0	1	2,1
<i>C. nubeculosus</i>	0	0,0	3	2,2	0	0,0	1	2,1
<i>C. maritimus</i>	8	2,2	2	1,5	18	6,8	2	4,2
<i>C. paolae</i>	22	5,9	6	4,5	10	3,8	1	2,1
<i>C. pictipennis</i>	1	0,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. univittatus</i>	1	0,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. parroti</i>	10	2,7	3	2,2	8	3,0	0	0,0
<i>C. jumineri</i>	3	0,8	3	2,2	0	0,0	0	0,0
Total	372	100	134	100	265	100	48	100

Tabla 11. Estado gonotrófico del total de especies de Culicoides capturadas en las trampas control y tratamiento con su porcentaje relativo al total de capturas.

Estado Gonotrófico	Control				Tratamiento			
	Nº Muertos	%	Nº Vivos	%	Nº Muertos	%	Nº Vivos	%
Nulípara	29	7,8	6	4,5	12	4,5	3	6,3
Para	44	11,8	12	9,0	33	12,5	8	16,7
Grávida	242	65,1	108	80,6	177	66,8	36	75,0
Macho	31	8,3	8	6,0	24	9,1	1	2,1
Sin abdomen	26	7,0	0	0,0	19	7,2	0	0,0
Total	372	100	134	100	265	100	48	100

3. Comparación de capturas entre los dos emplazamientos seleccionados para la ubicación de las trampas

Durante el periodo de estudio se muestrearon un total de 16 noches (12 noches de muestreo más 4 noches en la que se muestreó sin mallas alrededor de las trampas). Los análisis de la varianza de las capturas mostraron diferencias significativas entre los dos emplazamientos elegidos para colocar las trampas con un intervalo de confianza del 95%. En la Figura 27 se muestra las capturas de las trampas con las mallas con y sin insecticida en cada uno de los emplazamientos de muestreo.

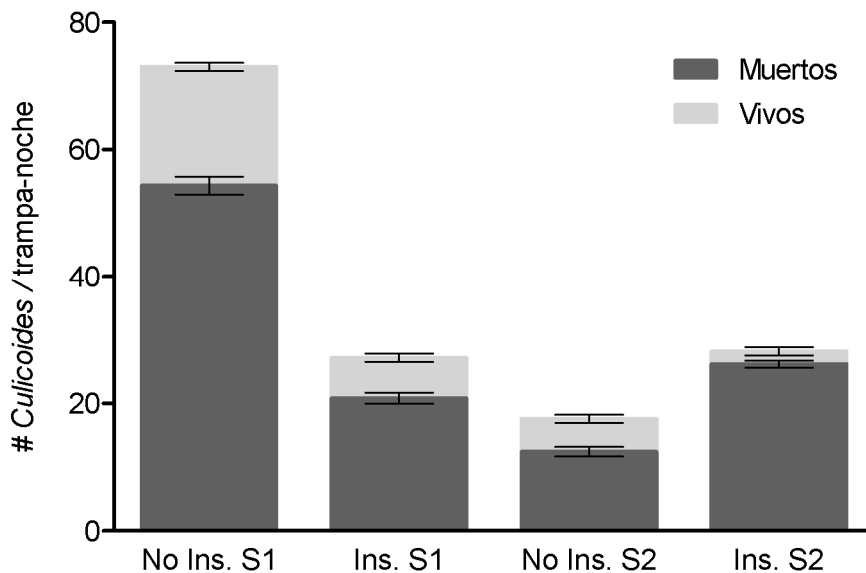


Figura 27. Recuento de capturas de *Culicoides* muertos y vivos durante las noches de muestreo junto con su error típico separados por tratamiento y sitio de ubicación de las trampas

4. Comparación de capturas de trampas ensayo con trampa exterior

La trampa exterior a la zona de ensayo demostró una mayor eficacia en la captura de *Culicoides* que cualquiera de las trampas utilizadas en el ensayo. Las capturas en la trampa control exterior demostraron que durante las noches que duró el ensayo la presencia de *Culicoides* volando en la zona era suficiente como para llevar a cabo el

muestreo. Sin embargo, no se observó que las capturas obtenidas por la trampa exterior se pudieran relacionar con las capturas obtenidas mediante la trampa control ($r = 0.27$) o mediante la trampa tratamiento ($r = 0.05$) (Tabla 12).

Tabla 12. Capturas de la trampa situada exteriormente a la zona de muestreo y de las trampas control y tratamiento. Se muestra el porcentaje relativo de capturas de las trampas de la zona de muestreo en relación a las capturas en la trampa exterior.

Trampa Exterior Nº Capturas	Control		Tratamiento	
	Nº Capturas	% de capturas en relación con la trampa exterior	Nº Capturas	% de capturas en relación con la trampa exterior
162	85	52,5	24	14,8
70	12	17,1	36	51,4
195	107	54,9	38	19,5
88	28	31,8	18	20,5
50	29	58,0	17	34,0
160	-	-	44	27,5
109	59	54,1	34	31,2
21	22	104,8	20	95,2
107	47	43,9	28	26,2
33	20	60,6	25	75,8
56	111	198,2	28	50,0
14	6	42,9	20	142,9

5. Comparación de capturas con y sin mallas

Durante un total de cuatro noches se realizaron capturas de insectos en los mismos emplazamientos y con las mismas trampas pero sin ningún tipo de mallas rodeándolas.

En las trampas sin malla durante esas cuatro noches se recolectaron una media de 64.7 *Culicoides*/noche (una trampa en cada emplazamiento). La media de capturas de la trampa con malla control fue de 90.6 *Culicoides*/noche (seis noches en un emplazamiento y cinco noches en otro). Por tanto, la media de capturas de la trampa con malla control fue un 39.9% superior a la media de capturas de las trampas sin mallas (Tabla 13), no ofreciendo ningún tipo de barrera física que impidiera la entrada de *Culicoides*.

Tabla 13. Número de ensayos (N), capturas totales, media de capturas por noche y porcentaje de capturas en las trampas con malla control y sin malla.

Trampa	N	Capturas		
		Totales	Media/noche	%
Malla Control	11	526	90,6	139,9
No Malla	8	259	64,8	100

6. Supervivencia de *Culicoides* en las trampas con mallas control y tratamiento

Durante el periodo que duró el ensayo, la supervivencia de los *Culicoides* capturados en la trampa control fue siempre superior a la de la trampa rodeada con malla insecticida (Fig. 28). En la trampa control los porcentajes de supervivencia oscilaron entre un 20.5 a un 61.1% de las capturas (media: 39.28%), mientras que en la trampa tratamiento oscilaron entre un 0.0 y un 33.3% (media: 16.5%). El análisis de la varianza mostró diferencias significativas en las tasas de supervivencia de los *Culicoides* capturados en la trampa control y tratamiento con un intervalo de confianza del 95%.

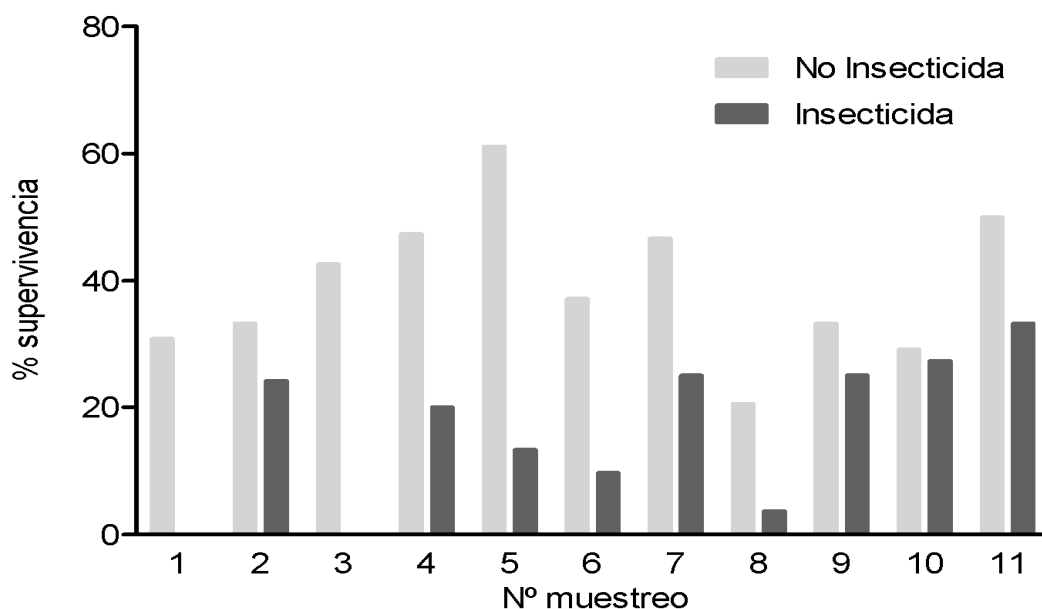


Figura 28. Porcentaje de supervivencia de las capturas de *Culicoides* en cada una de las trampas de ensayo durante once noches de muestreo.

7. Comparación de recolección de *Culicoides* aspirados en la base de las estructuras

Las bases de polietileno de las estructuras se aspiraron un total de 4 noches para cada una de las trampas. El número de *Culicoides* obtenidos como resultado de las aspiraciones fue bajo comparado con las capturas de las trampas (9 ejemplares totales en la base tratamiento y 9 ejemplares en la base control). Las especies recogidas en la base control fueron *C. circumscriptus* (7 ejemplares) y *C. cataneii* (2 ejemplares), 8 individuos grávidos y un macho. En la base tratamiento las especies recolectadas fueron *C. circumscriptus* (5 ejemplares), *C. cataneii* (1 ejemplar), *C. imicola* (1 ejemplar), *C. newsteadi* (1 ejemplar) y *C. pictipennis* (1 ejemplar). De estos se obtuvo 1 hembra nulípara, 7 grávidas y 1 macho. La media de las recolecciones durante esas cuatro noches fue de 2.2 *Culicoides*/noche para la estructura control y de 2.6 *Culicoides*/noche para la estructura tratamiento. Debido a la baja cantidad de capturas en las bases de polietileno no se realizó el análisis estadístico entre las estructuras tratamiento y control.

El análisis de la fauna acompañante tanto en las trampas control como en tratamiento indicó que no hubo un efecto negativo importante sobre especies de insectos de relevancia (polinizadores, endemismos y especies protegidas).

5.5.3 DISCUSIÓN

En el presente estudio, el cierre total de las estructuras de las trampas con malla, incluso por su parte superior, aseguraba que los *Culicoides* capturados hubiesen pasado a través de estas mallas impregnándose con el insecticida ensayado (deltametrina). Aún así, no se observó un efecto claro de las mallas tratadas en la captura total de *Culicoides*, ya que no se han obtenido diferencias significativas entre las capturas totales del control y tratamiento. Otros estudios realizados mediante la interposición de barreras físicas tratadas con insecticidas abiertas por su parte superior demostraron la limitada efectividad de estas barreras en el control de *Culicoides* sin poder precisar si los *Culicoides*

capturados atravesaban las barreras tratadas o las superaban sobrevolándolas (Calvete *et al.*, 2010).

En cuanto a la supervivencia de los *Culicoides*, sí que se obtuvieron diferencias significativas entre control y tratamiento. Por tanto, aunque el número de individuos que pasan a través de las mallas tratamiento no sea estadísticamente diferente del control, sí que lo es el número de individuos que sobreviven una vez han atravesado la malla, siendo la supervivencia de los *Culicoides* en el control un 22.7% superior al tratamiento. De esta manera, se protege a los animales ya que una proporción de los insectos que atraviesan las mallas insecticidas morirán en un breve periodo de tiempo (*ver apartado 5.4.2 del presente trabajo*), con lo que se evitarán picaduras infectivas sobre el ganado susceptible o, en el caso que estas se produzcan, se evitaría la transmisión de la infección sobre un tercer animal.

La especie de *Culicoides* dominante en las capturas fue *C. circumscriptus* (56.7%) y en segundo lugar *C. imicola* (22.8%). El pico de abundancia obtenido para *C. imicola* (principal especie implicada en la transmisión de la LA en la cuenca mediterránea) se corresponde con las publicaciones de Miranda y col. sobre las observaciones de la abundancia y estacionalidad de esta especie en las Islas Baleares (Miranda *et al.*, 2004). La instalación de mallas tratadas con insecticida en el exterior de los establos, como la malla impregnada con deltametrina ensayada en el presente estudio, podría suponer un método alternativo a la estabulación nocturna del ganado. De esta manera se evitaría el confinamiento de los animales y la instalación de mallas mosquiteras en ventanas y zonas abiertas del establo que comprometen una aireación correcta de las zonas de descanso del ganado y no son recomendables (Porter, 1959). La estabulación nocturna de los animales susceptibles a la infección de LA durante las épocas del año en que esta especie es abundante podría ser una medida de protección para disminuir sensiblemente los riesgos de transmisión debido al demostrado carácter exofílico de *C. imicola* (Barnard, 1997; Meiswinkel *et al.*, 2000). Sin embargo, en estudios de campo realizados sobre poblaciones españolas de *C. imicola*, más del 75% de las capturas de esta especie se realizaron en el interior de los establos, poniendo en duda este asumido comportamiento exofílico e indicando que *C. imicola* es también capaz de entrar activamente en los establos en busca de hospedadores sobre los que alimentarse (Calvete *et al.*, 2009).

Las especies del complejo *Obsoletus* se capturaron en una proporción del 2.8%, normal para la época si se tiene en cuenta que su máximo poblacional está comprendido entre mayo y julio en las Baleares (Miranda *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos a partir de la comparación de las capturas de las trampas con y sin malla alrededor indican que la interposición de una barrera física no supone ningún tipo de protección para los animales. Estudios realizados en Australia mediante barreras físicas, supuestamente impenetrables para los *Culicoides* (tarpaulinas), no evitaron completamente la entrada de estos insectos (Doherty *et al.*, 2004). En nuestros resultados, la media de capturas obtenidas con las trampas rodeadas con mallas fue superior a la media de trampas sin mallas. De este modo, nuestros resultados confirman las observaciones de Calvete y col. en cuanto a que el tratamiento de las mallas es imprescindible si se quiere ofrecer algún tipo de protección al ganado (Calvete *et al.*, 2010). Aún así, en el presente estudio, un número importante de *Culicoides* consiguió atravesar las mallas insecticidas y mantenerse con vida hasta su recogida al día siguiente. Por tanto, se hace necesario combinar las mallas insecticidas con otros métodos de protección, como la aplicación de insecticida sobre los animales, de manera que se asegure que *Culicoides* infectados no lleguen a alimentarse sobre los animales (Mullens *et al.*, 2000; Doherty *et al.*, 2004; Mehlhorn *et al.*, 2008b)

Los análisis realizados de las muestras recogidas de las bases de las estructuras con la malla insecticida indicaron que la dosis utilizada no fue lo suficientemente elevada como para que los insectos murieran por un efecto de choque del insecticida (knock-down). El mismo tipo de malla insecticida ensayada en laboratorio indicó que esta ofrece un efecto de choque muy rápido (< 30s) para los *Culicoides* que entran en contacto con ella (*ver apartado 5.4.2 del presente trabajo*). Sin embargo, en condiciones de campo, los porcentajes de mortalidad obtenidos en las poblaciones de *Culicoides* son muy inferiores a los observados en laboratorio y sería necesario realizar estudios que indiquen las concentraciones mínimas de deltametrina para que los *Culicoides* que entran en contacto con las mallas impregnadas no vivan lo suficiente como para poder seguir volando hasta alcanzar los animales sobre los que alimentarse. En futuros estudios se tendría que comprobar el efecto del insecticida a largo plazo (seguimiento de la mortalidad durante las horas posteriores a la recolección) para determinar los efectos residuales de la deltametrina sobre los insectos

6. RECAPITULACIÓN

La enfermedad de la Lengua Azul ha sido un problema en Europa desde que, a partir de 1998, se ha ido expandiendo progresivamente hacia el interior del continente. Las medidas de control establecidas en los distintos países para evitar nuevos focos de la enfermedad han tenido hasta el momento un éxito limitado, y nuevos serotipos del virus han conseguido colonizar regiones en las que se pensaba que debido a las bajas temperaturas, no serían capaces establecerse. En el presente trabajo se han realizado diversos estudios encaminados al control de la transmisión de la enfermedad producida por el VLA a partir del estudio de sus insectos vectores.

Los estudios realizados en la presente tesis han sido los siguientes:

- Comparación de sistemas de seguimiento y captura de especies de *Culicoides* spp. vectoras del Virus de la Lengua Azul asociadas a explotaciones ganaderas de las Islas Baleares. Implicaciones en la determinación del Periodo de “Bajo Riesgo de Transmisión”.
- Tasas de recuperación de los serotipos víricos de la LA -1, -2, -4 y -8 ocurridos en España a partir de poblaciones sudafricanas de *C. imicola* infectadas oralmente.
- Determinación de la sensibilidad de *Culicoides* spp. a la deltametrina mediante la utilización de cámaras de ensayo de la OMS.
- Estudios de sensibilidad de *Culicoides* spp. a mallas impregnadas con deltametrina mediante la utilización de cámaras de ensayo de la OMS.
- Evaluación de la eficacia en condiciones de campo de mallas tratadas con deltametrina en el control de *Culicoides* spp.

Los resultados obtenidos a partir del primero de los estudios mencionados han permitido comparar varios tipos de trampas que se utilizan, o han sido utilizadas, como método principal de captura para la monitorización de *Culicoides* spp. en varios países. De esta manera, se han podido establecer relaciones de eficiencia entre los distintos tipos de trampas ensayadas, así como establecer criterios que permitan la comparación de datos de capturas de estos insectos en diferentes países. Este aspecto es importante debido a que las restricciones de movimientos que se establecen de animales y sus productos debido a la enfermedad de la LA están determinados por la captura de un número concreto de vectores mediante trampas de luz. El establecimiento de un patrón común en el uso de trampas y en la determinación de las capturas a nivel internacional permite ofrecer planes de protección más fiables y seguros que en los casos en que cada país utilice sus propios criterios de captura. La determinación de la sensibilidad de las trampas en condiciones de baja densidad poblacional ha permitido establecer criterios para establecer los denominados periodos de ‘Bajo Riesgo de Transmisión’ según el tipo de trampa utilizada. Estos son los datos que se utilizan a nivel legislativo para determinar el grado de protección que se debe establecer en una región con el fin de prevenir futuros brotes de la enfermedad. Otros aspectos importantes de este estudio han sido la determinación de la influencia del emplazamiento de la trampa a la hora de capturar estos dípteros y la eficacia relativa de una trampa determinada en la captura del vector predominante en una zona. De esta manera, se ha observado que las trampas más eficaces a la hora de capturar *Culicoides* son la trampa Onderstepoort y la mini-CDC. La cantidad total de *Culicoides* que pueda capturar una determinada trampa no es especialmente importante desde el punto de vista epidemiológico, ya que el número de individuos que se puedan capturar mediante trampas es muy inferior al que circula en el ambiente y, en ningún caso, nos puede servir para controlar las poblaciones de vector. Sin embargo, hasta el momento es el método más práctico que tenemos para determinar la presencia y la magnitud de la población y el número de especies. Además, en determinados estudios, como son los ensayos de competencia vectorial, se necesita la captura de un elevado número de ejemplares para obtener resultados estadísticamente significativos. Para la realización de este tipo de ensayos se han utilizado en el presente ensayo las trampas con las que hemos obtenido mayores capturas (Onderstepoort o mini-CDC) dependiendo de la época del año. Los *Culicoides* capturados mediante estas trampas nos han permitido

conocer la compatibilidad que los serotipos del VLA que han circulado por la Península Ibérica y Baleares (serotipos 1, 2, 4 y 8) tienen sobre las poblaciones sudafricanas de *Culicoides*. Los estudios de sensibilidad oral de las distintas especies de *Culicoides* son cruciales para incriminar nuevos vectores de la enfermedad así como para determinar la implicación de los vectores conocidos en la transmisibilidad de una determinada cepa vírica. Una vez conocida la capacidad de infección con el VLA sobre una determinada especie, podemos delimitar zonas de riesgo de acuerdo con las capturas obtenidas mediante las trampas de luz y la abundancia de vectores más o menos competentes en la zona, conociendo su estacionalidad y teniendo en cuenta que las hembras paras son las únicas que, en principio, son capaces de transmitir el virus a los animales.

Debido a la imposibilidad de controlar las poblaciones de vectores de la LA cuando estos se encuentran en su pico estacional y a los problemas ambientales que se presentarían si se utilizara la fumigación ambiental, se ha optado por la protección de los animales a la hora de evitar futuras transmisiones de la enfermedad. En este aspecto, las vacunas contra los distintos serotipos del virus pueden no estar siempre disponibles cuando se produce un brote de la enfermedad de un serotipo no común en la zona. En estos casos, la protección de los animales con insecticidas se hace esencial para evitar la expansión del brote. Para ello primero se realizan ensayos en laboratorio para determinar la eficacia de determinados insecticidas sobre los vectores de la LA. En nuestro estudio se utilizaron papeles impregnados con distintas concentraciones de deltametrina y se determinaron las dosis que eliminaban al 50 y 90% de la población ensayada. De esta manera, se han podido conocer las dosis mínimas necesarias para realizar un control eficaz sobre las poblaciones de *Culicoides*. Una vez comprobado que el insecticida utilizado (deltametrina) produce una elevada respuesta en las distintas especies de *Culicoides* a determinadas dosis, se han realizado pruebas de laboratorio y campo con mallas impregnadas con este piretroide. Se decidió comprobar la eficacia de este método en el control de *Culicoides*, ya que hasta el momento existen pocos estudios realizados con mallas insecticidas sobre las poblaciones de estos vectores. Se observó que su eficacia en evitar que las distintas especies de este insecto atravesaran con vida las mallas era inferior a la esperada según los resultados obtenidos en laboratorio, ya que un porcentaje de vectores consigue atravesar las mallas sin verse afectado por el compuesto insecticida. Sin embargo, la utilización de las mallas insecticidas ofrecen protección a los animales ya

que reducen de manera significativa la supervivencia de *Culicoides* que entran en contacto con ellas reduciendo la presión de picaduras sobre los animales. El tratamiento de las larvas de *Culicoides* es un tarea complicada debido a la ineficiencia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelinesis* sobre estas y a la dificultad de eliminar todos los posibles sitios de cría. Sin embargo, la combinación de las mallas tratadas con deltametrina con otras prácticas, como la aplicación de insecticidas sobre los animales o el manejo de la explotación con métodos culturales correctos, podría romper los ciclos de transmisión de la enfermedad de la LA y disminuir de manera significativa su incidencia sobre los animales de granja.

En futuros trabajos se tendría que evaluar la eficacia de las mallas tratadas con deltametrina colocadas sobre las paredes interiores de los establos con el fin de determinar la eficacia insecticida sobre las poblaciones de *Culicoides* endofílicas.

7. CONCLUSIONES

1- Se han encontrado diferencias notables entre los distintos tipos de trampas ensayadas. En primavera, cuando hay una mayor proporción de las especies del **complejo Obsoletus**, la trampa **mini-CDC** fue la que presentó **mayor eficacia** en las capturas comparado con trampas Onderstepoort, Pirbright y Rieb. Sin embargo, en otoño, cuando tiene lugar el pico poblacional de *C. imicola*, la trampa **más eficaz** ensayada fue la **Onderstepoort**. En consecuencia, tanto la trampa Onderstepoort como la mini-CDC son adecuadas para el seguimiento de las poblaciones de *Culicoides* de nuestra zona.

2- De las trampas ensayadas en este estudio, la trampa **Onderstepoort** es la que presenta **mayor sensibilidad** en la captura de *Culicoides* en condiciones de baja densidad poblacional por lo que se recomienda este tipo de trampa para establecer de manera estándar los periodos de “**Bajo Riesgo de Transmisión del VLA**”.

3- Tanto la trampa **Onderstepoort** como la **mini-CDC** son sensibles en la **detección del incremento** de las poblaciones de *Culicoides* durante el periodo primaveral.

4- La trampa **Pirbright** **no** ofrece ninguna **ventaja** (sensibilidad, número de capturas, número de especies, etc.) sobre las otras dos trampas ensayadas. Por tanto, las trampas Onderstepoort y mini-CDC serían más indicadas que la trampa Pirbright para estudios sobre poblaciones de *Culicoides*.

5- Existe un marcado “**Efecto por Sitio**” que debe tenerse en cuenta a la hora de colocar trampas para la captura de *Culicoides*. Se recomienda la colocación de varias trampas para detectar los lugares con mayor abundancia de estos insectos.

6- Se ha demostrado que las **poblaciones sudafricanas** de *C. imicola* son **compatibles con** al menos tres de los cuatro serotipos españoles del VLA (**VLA-1, -2 y -4**) ensayados.

7- Se ha comprobado que *C. imicola* presenta una **baja susceptibilidad oral** a la infección con los serotipos del VLA ensayados (**VLA-1, -2, -4 y -8**) comparado con otras especies vectoras (ej. *C. bolitinos*). **Sin embargo**, su abundancia en ciertas regiones geográficas determina que su **capacidad de transmisión** del VLA sea **elevada**.

8- Se ha demostrado la **efectividad de los ensayos de la OMS** de evaluación de insecticidas frente a las poblaciones de *Culicoides*. De esta manera se ha contribuido a la **estandarización del protocolo** para la realización de bioensayos con estos insectos.

9- Dosis del 0.00017% de **deltametrina** impregnadas en papeles Whatman fueron suficientes para eliminar el 90% de la población de insectos ensayados, por lo que se comprueba la **elevada eficacia** de este piretroide frente a las distintas especies de *Culicoides* adultos. La utilización de este insecticida se recomienda, por tanto, para el desarrollo de fórmulas comerciales destinadas al control de poblaciones de las especies vectoras del VLA.

10- Las **mallas impregnadas con deltametrina** (ZeroVector[®] Durable Lining, Asociación Dart) han demostrado **gran eficacia** frente las especies *C. obsoletus* y *C. imicola* en los ensayos de sensibilidad realizados **en laboratorio**, *eliminando > 90%* de los insectos que se pusieron en contacto ellas durante 10 s.

11- En campo, las **mallas sin tratar no** supusieron ninguna **barrera** a la entrada de *Culicoides*.

12- En condiciones de campo, las **mallas impregnadas con deltametrina** (ZeroVector[®] Durable Lining, Asociación Dart) **no evitaron** por completo **que** una parte de la población de *Culicoides* **las atravesaran**.

13- La **mortalidad** de las poblaciones de *Culicoides* que atravesaron las **mallas impregnadas con deltametrina** fue **>50%** a la de aquéllas que atravesaron la malla control.

14- La utilización de las **mallas insecticidas** supone una **disminución** del número de *Culicoides* que se alimentan sobre los animales disminuyendo así la **transmisión del virus** de la LA.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, W.S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, **18**, 265-267.
- Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., Estrada, R., Luz Márquez, A., Angel Miranda, M., Gortázar, C., Lucientes, J. (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), e14236.
- Afshar, A. (1994) Bluetongue: Laboratory diagnosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **17**, 221-242.
- Alba, A., Casal, J. y Domingo, M. (2004) Possible introduction of Bluetongue into the Balearic Islands, Spain, in 2000, via air streams. *Veterinary Record*, **155** (15), 460-461.
- Alexander, G.I., Alexander, M.P. y St. George, T.D. (1996) Bluetongue; its impact on international trade in meat and livestock. In: *Proceedings of the First Southeast Asia and Pacific Regional Bluetongue Symposium. Kunming, August 22–24, 1995*, pp. 254–258. Edited by T. D. St George & P. Kegao. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research.
- Alexander, K.A., MacLachlan, N.J., Kat, P.W., House, C., O'Brien, S.J., Lerche, N.W., Sawyer, M., Frank, L.G., Holekamp, K. y Smale, L. (1994) Evidence of natural Bluetongue virus infection among African carnivores. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **51** (5), 568-575.
- Allepuz, A., García-Bocanegra, I., Napp, S., Casal, J., Arenas, A., Saez, M. y Gonzalez, M.A. (2010) Monitoring Bluetongue disease (BTV-1) epidemic in southern Spain during 2007. *Preventive Veterinary Medicine*, **96**, 263-271.
- Anderson, J.R. y Linhares, A.X. (1989) Comparison of several different trapping methods for *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, **5**, 325-334.

Apperson, C.S. y Yows, D.G. (1976) Laboratory evaluation of the activity of insect growth regulators against *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Mosquito News*, **36**, 203-204.

Atkinson, C.T. (1990) Fine structure and sporogonic development of a *Vavraia* sp. (Microsporida: Pleistophoridae) in the biting midge *Culicoides edeni* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, **55**, 105-111.

Arnaud, P.H. (1956) The heleid genus *Culicoides* in Japan, Korea and Ryukyu Islands (Insecta: Diptera), *Microentomology*, **21**, 84-207

Baldet T, Delecolle, J.C., Cetre-Sossah, C., Mathieu, B., Meiswinkel, R., Gerbier, G. y (2008) Indoor activity of *Culicoides* associated with livestock in the Bluetongue virus (BTV) affected region of northern France during autumn 2006. *Preventive Veterinary Medicine*, **87** (1-2), 84-97.

Balenghien, T. (2008) *Culicoides chiopterus*: Confirmation of its status as potential vector of Bluetongue virus in Europe. *ProMed-mail*. International Society for Infectious Diseases, Brookline, MA.

Barnard, D.R. (2005) Biological assay methods for mosquito repellents. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **21**, 12-16.

Barnard, B.J.H. (1997) Some factors governing the entry of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) into stables. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **64**, 227-233.

Barros, S.C., Ramos, F., Luís, T.M., Vaz, A., Duarte, M., Henriques, M., Cruz, B. y Fevereiro, M. (2007) Molecular epidemiology of Bluetongue virus in Portugal during 2004-2006 outbreak. *Veterinary Microbiology*, **124**, 25-34.

Bauer, B., Jandowsky, A., Schein, E., Mehltitz, D. y Clausen, P.H. (2009) An appraisal of current and new techniques intended to protect bulls against *Culicoides* and other haematophagous nematocera: The case of Schmergow, Brandenburg, Germany. *Parasitology Research*, **105**, 359-365.

- Baylis, M. y Rawlings, P. (1998) Modelling the distribution and abundance of *Culicoides imicola* in Morocco and Iberia using climatic data and satellite imagery. *Archives of Virology*, **14**, 137-153.
- Baylis, M., Hasnaoui, H., Bouayoune, J. y Touti, J. (1997) The spatial and seasonal distribution of African Horse Sickness and its potential *Culicoides* vectors in Morocco. *Medical and Veterinary Entomology*, **11** (3), 203-212.
- Baylis, M., Parkin, H., Kreppel, K., Carpenter, S., Mellor, P.S. & McIntyre, K.M. (2010) Evaluation of housing as a means to protect cattle from *Culicoides* biting midges, the vectors of Bluetongue virus. *Medical and Veterinary Entomology*, **24**, 38-45.
- Beaty, B.J. y Marquardt, W.C. (1996) The biology of disease vectors. *University Press of Colorado*, ISBN 0870814117.
- Bishop, A.L., Worrall, R., Spohr, L.J., McKenzie, H.J., Barchia, I.M. (2004) Response of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) to light-emitting diodes. *Australian Journal of Entomology*, **43**, 184-188
- Bishop, A.L., McKenzie, H.J., Spohr, L.J. y Barchia, I.M. (1994) *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) in different farm habitats. *Australian Journal of Zoology*, **42**, 379-384.
- Bonneau, K.R., DeMaula, C.D., Mullens, B.A. y Maclachlan, N.J. (2002) Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in Bluetongue virus-infected cattle and sheep. *Veterinary Microbiology*, **88**, 115-125.
- Boorman, J. (1974) The maintenance of laboratory colonies of *Culicoides variipennis* (coq.) *C. nubeculosus* (mg.) and *C. riethi* kieff. (Diptera: Ceratopogonidae). *Bulletin of Entomological Research*, **64**, 371-377.
- Boorman, J. (1986) Presence of Bluetongue virus vectors on Rhodes. *The Veterinary Record*, **118**, 21-21.

Boorman, J. (1988) A key to the genera of British Ceratopogonidae (Diptera). *Entomologist's Gazette*, **39**, 65-73.

Boorman, J. (1991) A review of *Culicoides* subgenus *Avaritia* species (Insecta: Diptera: Ceratopogonidae) vectors of viruses of sheep, cattle and horses, with particular reference to *Culicoides imicola* in Europe and the Mediterranean region. *A Report Prepared for the Overseas Development Administration. The Natural History Museum, London.*

Boorman, J., Jennings, M., Mellor, P.S., Wilkinson, P., Barber, T.L. y Jochim, M.M. (1985) Further data on the distribution of biting midges in southern Europe and the Mediterranean area, with special reference to *C. imicola*. *Bluetongue and Related Orbiviruses*, New York, Alan R. Liss Inc. 187-190.

Borden, E.C., Shope, R.E. y Murphy, F.A. (1971) Physicochemical and morphological relationships of some arthropod-borne viruses to Bluetongue virus – a new taxonomic group. Physicochemical and serological studies. *Journal of General Virology*, **13**, 261–271.

Borkent, A. y Wirth, W.W. (1997) *World Species of Biting Midges*, Research Associate of the Royal British Columbia Museum, American Museum of Natural History, and Instituto Nacional de Biodiversidad.

Bowne, J.G. y Jones, R.H. (1966) Observations on Bluetongue virus in the salivary glands of an insect vector, *Culicoides variipennis*. *Virology*, **30**, 127-133.

Braverman, Y. y Hulley, P.E. (1979) The relationship between the numbers and distribution of some antennal and palpal sense organs and host preference in some *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from Southern Africa. *Journal of Medical Entomology*, **15** (5), 419-424.

Braverman, Y. y Linley, J. (1988) Parity and voltinism of several *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) in Israel, as determined by two trapping methods. *Journal of Medical Entomology*, **25**, 121-126.

Braverman, Y. y Rubina, M. (1976) Light trapping of biting insects in poultry houses in Israel. *Israel Journal of Zoology*, **25**, 95-101.

- Braverman, Y. y Chechik, F. (1996) Air streams and the introduction of animal diseases borne on *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) into Israel. *Revue Scientifique Et Technique De L'Office International Des Epizooties*, **15**, 1037-1052.
- Braverman, Y., Galun, R. y Ziv, M. (1974) Breeding sites of some *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in Israel. *Mosquito News*, **34**, 303-308.
- Braverman, Y., Linley, J.R., Marcus, R. y Frish, K. (1985) Seasonal survival and expectation of infective life of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) in Israel, with implications for Bluetongue virus transmission and a comparison of the parous rate in *C. imicola* from Israel and Zimbabwe. *Journal of Medical Entomology*, **22**, 476-484.
- Braverman, Y. y Mumcuoglu, K. (2009) Newly emerged nulliparous *Culicoides imicola* (kiewfer) (Diptera: Ceratopogonidae) with pigmented abdomen. *Veterinary Parasitology*, **160**, 356-358.
- Braverman, Y., Ungar-Waron, H., Frith, K., Adler, H., Danieli, Y., Baker, K. y Quinn, P. (1983) Epidemiological and immunological studies of sweet itch in horses in Israel. *Veterinary Record*, **112**, 521-524
- Cagienard, A., Griot, C., Mellor, P.S., Denison, E. y Stärk, K.D.C. (2006) Bluetongue vector species of *Culicoides* in Switzerland. *Medical and Veterinary Entomology*, **20**, 239-247.
- Calvete, C., Estrada, R., Miranda, M., del Río, R., Borràs, D., Beldron, F., Martínez, A., Calvo, A. y Lucientes, J. (2009) Entry of bluetongue vector *Culicoides imicola* into livestock premises in Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, **23**, 202-208.
- Calvete, C., Estrada, R., Miranda, M.A., del Río, R., Borràs, D., Beldron, F.J., Martinez, A., Calvo, A.J. y Lucientes, J. (2010) Protection of livestock against Bluetongue virus vector *Culicoides imicola* using insecticide-treated netting in open areas. *Medical and Veterinary Entomology*, **24**, 169-175.

- Calvete, C., Miranda, M.A., Estrada, R., Borràs, D., Sarto, V., Collantes, F., García de Francisco, J.M., Moreno, N. y Lucientes, J. (2006) Spatial distribution of *Culicoides imicola*, the main vector of Bluetongue virus, in Spain. *Veterinary Record*, **158** (4), 130-131.
- Campano López, A. y Sánchez Botija, C. (1958) L'epizootie de fièvre catarrhale ovine en Espagne (Blue Tongue). *Bulletin De l'Office International Des Epizooties*, **50**, 65-93.
- Campbell, J.A. y Pelham-Clinton, B.A. (1960) A taxonomic review of the British species of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae). *Proceedings of the Royal Society of Edimburg*, LXVII.
- Capela, R., Sousa, C., Pena, I. y Caeiro, V. (1993) Preliminary note on the distribution and ecology of *Culicoides imicola* in Portugal. *Medical and Veterinary Entomology*, **7**, 23-26.
- Caracappa, A., Torina, A., Guercio, A., Vitale, F., Calabrò, A., Purpari, G., Ferrantelli, V., Vitale, M. y Mellor, P.S. (2003) Identification of a novel Bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Veterinary Record*, **153**, 71-74.
- Carpenter, S., Eyres, K., McEndrick, I., Smith, L., Turner, J., Mordue, W. y Mordue, A.J. (2005) Repellent efficiency of bayrepel against *Culicoides impunctatus* (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasitology Research*, **95**, 427-429.
- Carpenter, S., Lunt, H.L., Arav, D., Venter, G.J. y Mellor, P.S. (2006) Oral susceptibility to Bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *Journal of Medical Entomology*, **43**, 73-78.
- Carpenter, S., Mellor, P. y Torr, S. (2007) Bluetongue and midge control. *Veterinary Record*, **161**, 633.
- Carpenter, S., Szmaraagd, C., Barber, J., Labuschagne, K., Gubbins, S. y 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**, 1237-1245.

- Carpenter, S., Wilson, A. y Mellor, P.S. (2009) *Culicoides* and the emergence of Bluetongue virus in northern Europe. *Trends in Microbiology*, **17**, 172–178.
- Chandler, J.A. y Highton, R.B. (1975) The succession of mosquito species (Diptera: Culicidae) in rice fields in the Kisumu area of Kenya, and their possible control. *Bulletin of Entomological Research*, **65**, 295-302.
- Cêtre-Sossah, C., Baldet, T., Delécolle, J.C., Mathieu, B., Perrin, A., Grillet, C. y Albina, E. (2004) Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of Bluetongue (BT) and African Horse Sickness (AHS) in Africa and Europe. *Veterinary Research*, **35**, 325-337.
- Chiang, C.L. y Reeves, W.C. (1962) Statistical estimation of virus infection rates in mosquito vector populations. *American Journal of Hygiene*, **75**, 377–391.
- Clavijo, A., Heckert, R.A., Dulac, G.C. y Afshar, A. (2000) Isolation and identification of Bluetongue virus. *Journal of Virological Methods*, **87**, 13-23.
- Clements Jr, B.W. y Rogers, A.J. (1968) Tests of larvicides for control of salt-marsh sand flies (*Culicoides*). *Mosquito News*, **28**, 529–534.
- Coetzer, J. y Tustin, R. (2004) *Infectious Diseases of Livestock*, Oxford University Press.
- Coetzer, J.A.W., Thomson, G.R. y Tustin, R.C. (1994) *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*, Cape Town; New York, Oxford University Press.
- Conraths, F.J., Kramer, M., Freuling, C., Hoffmann, B., Staubach, C., Gethmann, J., Teifke, J., Mettenleiter, T.C. y Beer, M. (2007) Bluetongue disease in Germany. Clinical aspects, diagnosis and epidemiology. *Prakt Tierarzt*, **88**, 9-15.
- Conte, A., Goffredo, M., Ippoliti, C. y Meiswinkel, R. (2007) Influence of biotic and abiotic factors on the distribution and abundance of *Culicoides imicola* and the *Obsoletus* complex in Italy. *Veterinary Parasitology*, **150**, 333-344.

De Deken, G., Madder, M., Deblauwe, I., De Clercq, K., Fassotte, C., Losson, B., Haubruge, E. y De Deken, R. (2008) Vector monitoring at Belgian outbreak sites during the Bluetongue epidemic of 2006. *Preventive Veterinary Medicine*, **87**, 64-73.

De Liberato, C., Scavia, G., Lorenzetti, R., Scaramozzino, P., Amaddeo, D., Cardeti, G., Scicluna, M.T., Ferrari, C. y Autorino, G.L. (2005) Identification of *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of Bluetongue virus in central Italy. *Veterinary Record*, **156**, 301-304.

DeMaula, C.D., Jutila, M.A., Wilson, D.W. y MacLachlan, N.J. (2001) Infection kinetics, prostacyclin release and cytokine-mediated modulation of the mechanism of cell death during Bluetongue virus infection of cultured ovine and bovine pulmonary artery and lung microvascular endothelial cells. *Journal of General Virology*, **82** (4), 787-794.

DeMaula, C.D., Leutenegger, C.M., Bonneau, K.R. y MacLachlan, N.J. (2002a) The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of Bluetongue. *Virology*, **296**, 330-337.

DeMaula, C.D., Leutenegger, C.M., Jutila, M.A. y MacLachlan, N.J. (2002b) Bluetongue virus-induced activation of primary bovine lung microvascular endothelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **86**, 147-157.

Dijkstra, E., Van Der Ven, I.J.K., Meiswinkel, R., Hölzel, D.R. y Van Rijn, P.A. (2008) *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Record*, **162**, 422.

Doherty, W.M., Bishop, A.L., Melville, L.F., Johnson, S.J., Bellis, G.A. y Hunt, N.T. (2004) Protection of cattle from *Culicoides* spp. in Australia by shelter and chemical treatments. *Veterinaria Italiana*, **40** (3), 320-323.

Du Toit, R.M. (1944) The transmission of Bluetongue and Horse-Sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry*, **19**, 7-16.

Dukes, J.C. y Axtell, R.C. (1976) Residual effectiveness of insecticide-treated screens for control of sand flies, *Culicoides furens* (Poey) (Diptera: Ceratopogonidae). *Mosquito News*, **36**, 488-491.

Dungu, B., Gerdes, T. y Smit, T. (2003) The use of vaccination in the control of Bluetongue in Southern Africa. *Veterinaria Italiana. Proceedings of the 3erd OIE Internationa Symposium on Bluetongue*, **40**, 616-622.

Dyce, A.L. (1969) The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *Australian Journal of Entomology*, **8**, 11-15.

Dye, C. (1992) The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. *Annual Review of Entomology*, **37**, 1-19.

Dzhafarov, S.M. (1964) Blood-sucking midges (Diptera: Heleidae) of the Transcaucasus. *Akademija Nauk Azerbaidzanskoi SSR, Instituta Zoologicheskij*, 414.

Dzhafarov, S.M., Institutu, Z. y Akademiǎsy, A.S.S.R.E. (1976) Biting Midges (Diptera: Heleidae) of Transcaucasus (Morphology, Biology, Ecology, Geographical Distribution, and Harmfulness, Control, Fauna of the Genera *Culicoides* *Leptoconops* and *Lasiohelea*), Franklin Book Programs.

EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). (2008) Scientific opinion of the panel on animal health and welfare. Bluetongue vectors and insecticides. *The EFSA Journal*, **735**, 1-70

Enderlein, G. (1908) Neue ceratopogoninen aus südafrika. *Denkschriften Der Medizinisch-Naturwissenschaftlichen Gesellschaft Zu Jena*, **13**, 459-461.

Erasmus, B.J. y Potgieter, C. (2009) The history of bluetongue. *Bluetongue* (ed. by P. Mellor, M. Baylis and P. Mertens) 7-21. Elsevier, London.

Fernández-Pacheco, P., Fernández-Pinero, J., Agüero, M. y Jiménez-Clavero, M. (2008) Bluetongue virus serotype 1 in wild mouflons in Spain. *Veterinary Record*, **162** (20), 659-660.

Ferrari, C., De Liberato, C., Scavia, G., Lorenzetti, R., Zini, M., Farina, F., Magliano, A., Cardeti, G., Scholl, F., Guidoni, M., Scicluna, M.T., Amaddeo, D., Scaramozzino, P. y Autorino, G.L. (2005) Active circulation of bluetongue vaccine virus serotype-2 among unvaccinated cattle in central Italy. *Preventive Veterinary Medicine*, **68**, 103-113.

Ferrari, J.A., Beaty, B.J. y Marquardt, W.C. (1996) Insecticide resistance. *The Biology of Disease Vectors*. 512-529. University Press of Colorado.

Finney, D. (1971) Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, UK

Finney, D.J. (1949) The adjustment for a natural response rate in probit analysis. *Annals of Applied Biology*, **36**, 187-195.

Floore, T.G. (1985) Laboratory wind tunnel tests of nine insecticides against adult *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae). *Florida Entomologist*, **68** (4), 678-682.

Frenzel, K. (2008) Insektizidbehandelte netze zur bekämpfung von tiermedizinisch bedeutenden vektoreuseuchen. *Tiergesundheitsdienst Bayern e. V. Bereich Lebensmittelhygiene*, Zusammenfassung der Ergebnisse der Phase 1 des Vorhabens.

Fu, H., Leake, C.J., Mertens, P.P.C. y Mellor, P.S. (1999) The barriers to Bluetongue virus infection, dissemination and transmission in the vector, *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Archives of Virology*, **144**, 747-761.

Gambles, R.M. (1949) Bluetongue of sheep in Cyprus. *Journal of Comparative Pathology*, **59**, 176-190.

Gerry, A.C. y Mullens, A. (2000) Seasonal abundance and survivorship of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) at a southern California dairy, with reference to potential Bluetongue virus transmission and persistence. *Journal of Medical Entomology*, **37**, 675-688.

Gerry, A. C., Mullens, B.A., MacLachlan, N.J. y Mecham, J.O. (2001) Seasonal transmission of Bluetongue virus by *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) at a southern California dairy and evaluation of vectorial capacity as a predictor of Bluetongue virus transmission. *Journal of Medical Entomology*, **38**, 197–209.

Gibbens, N. (2012) Schmallenberg virus: A novel viral disease in northern Europe. *Veterinary Record*, **170**, 58-58.

Gibbs, E.P.J. y Greiner, E.C. (1994) The epidemiology of Bluetongue. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **17**, 207-220.

Giovannini, A., Calistri, P., Conte, A., Savini, L., Nannini, D., Patta, C., Santucci, U. y Caporale, V. (2004) Bluetongue virus surveillance in a newly infected area. *Veterinaria Italiana*, **40**, 188-197.

Goffredo, M. y Meiswinkel, R. (2004) Entomological surveillance of bluetongue in Italy: Methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. *Veterinaria Italiana*, **40** (3), 260-265.

Goffredo, M., Calistri, P., Capelli, G., Dottori, M., Mignone, W., Accorsi, A., Calzolari, M., Giuliano, I., Montarsi, F., Di Nicola, F., Micarelli, G., Ippoliti, C. y Lelli, R. (2008) Distribution and abundance of BTV-8 potential vectors in northern Italy. *Proceedings of the Bluetongue Satellite Symposium “Bluetongue in Europe, Back to the Future!!”*. Brescia, Italy.

Goffredo, M., Satta, G., Torina, A., Federico, G., Scaramozzino, P., Cafiero, M.A., Lelli, R. y Meiswinkel, R. (2001) The 2000 Bluetongue virus (BTV) outbreak in Italy: distribution and abundance of the principal vector *Culicoides imicola* Kieffer, *Proceedings of the 10th International Symposium of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (AAVLD) and OIE Seminar on biotechnology*, Salsomaggiore, Parma, 4-7.

Gómez-Tejedor, C. (2004) Brief overview of the Bluetongue situation in Mediterranean Europe, 1998-2004. *Veterinaria Italiana*, **40**, 57-60.

Gomulski, L.M., Meiswinkel, R., Delécolle, J.C., Goffredo, M. y Gasperi, G. (2005) Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Systematic Entomology*, **30** (4), 619-631

Gubbins, S., Carpenter, S., Baylis, M., Wood, J.L.N. y Mellor, P.S. (2008) Assessing the risk of Bluetongue to UK livestock: Uncertainty and sensitivity analyses of a temperature-dependent model for the basic reproduction number. *Journal of the Royal Society Interface*, **5** (20), 363-371.

Gutsche, T. (1979) There was a man: The life and times of Sir Arnold Theiler, *K. C. M. G., of Onderstepoort*, Cape Town, Howard Timmins

Hardy, W.T. y Price, D.A. (1952) Soremuzzle of sheep. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **120**, 23-25.

Hill, M.A. y Roberts, E.W. (1947) An investigation into effects of gammexane on the larvae, pupae and adults of *Culicoides impunctatus* Goetghebuer and on the adults of *Culicoides obsoletus* Meigen. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **41**, 143-163.

Hofmann, M., Griot, C., Chaignat, V., Perler, L. y Thur, B. (2008a) Bluetongue disease reaches Switzerland. *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde*, **150**, 49-56.

Hofmann, M.A., Renzullo, S., Mader, M., Chaignat, V., Worwa, G. y Thuer, B. (2008b) Genetic characterization of Toggenburg orbivirus, a new Bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerging Infectious Diseases*, **14**, 1855-1861.

Hoffmann, B., Sasserath, M., Thalheim, S., Bunzenthal, C., Strebelow, G. y Beer, M. (2008c) Bluetongue virus serotype 8 reemergence in Germany, 2007 and 2008. *Emerging Infectious Diseases*, **14** (9), 1421-1423.

Holbrook, F., Beaty, B. y Marquardt, W. (1996) Biting midges and the agents they transmit. *The Biology of Disease Vectors*, 110-116.

Holbrook, F.R. y Mullens, B.A. (1994) Effects of ivermectin on survival, fecundity, and egg fertility in *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of American Mosquito Control Association*, **10**, 70-73.

Holbrook, F.R. y Wuerthele, W. (1984) A lightweight, hand-portable vehicle-mounted insect trap (*Culicoides variipennis*). *Mosquito News*, **44** (2), 239-242.

House, C., Mikiciuk, P.E. y Berninger, M.L. (1990) Laboratory diagnosis of African Horse Sickness: Comparison of serological techniques and evaluation of storage methods of samples for virus isolation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*, **2**, 44-50.

Howell, P.G. (1970) The antigenic classification and distribution of naturally occurring strains of Bluetongue virus. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, **41**, 215-223.

Hribar, L.J. y Murphree, C.S. (1987) *Heleidomermis* sp. (Nematoda: Mermithidae) infecting *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Alabama. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **3** (2), 332

Hunt, G.J., Tabachnick, W.J. y McKinnon, C.N. (1989) Environmental factors affecting mortality of adult *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) in the laboratory. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **5** (3), 387-391

Jamnback, H. (1963) Further observations on the effectiveness of chemically treated screens in killing biting midges, *Culicoides sanguisuga* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Economic Entomology*, **56**, 719-720.

Jamnback, H. (1965) The *Culicoides* of New York state (Diptera: Ceratopogonidae) *Bulletin / New York State Museum and Science Service*, ed. State Education Dept.

Jandowsky, A., Schein, E., Clausen, P.H., Sievert, K. y Bauer, B. (2009) Vorkommen und verbreitung von insektizidresistenzen bei fliegen (*Musca domestica* L.) in Milchviehbetrieben brandenburgs. In, *Tagung Der DVG-Fachgruppe "Parasitologie Und Parasitäre Krankheiten"*, Leipzig, 47-48.

Jauniaux, T.P., De Clercq, K.E., Cassart, D.E., Kennedy, S., Vandebussche, F.E., Vandemeulebroucke, E.L., Vanbinst, T.M., Verheyden, B.I., Goris, N.E. y Coignoul, F.L. (2008) Bluetongue in Eurasian lynx. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (9), 1496-1498.

Jennings, D.M. y Mellor, P.S. (1988) The vector potential of British *Culicoides* species for Bluetongue virus. *Veterinary Microbiology*, 17, 1-10.

Jennings, D.M. y Mellor, P.S. (1987) Variation in the responses of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) to oral infection with Bluetongue virus. *Archives of Virology*, 95, 177-182.

Jess, S., Kearns, C. y Matthews, D.I. (2007) A survey of annual pesticide usage during the control of sheep ectoparasites in northern Ireland, 2005. *Pest management Science*, 56 (12), 995-1004.

Jones, R.H. (1961) Equipment for blood feeding and holding large numbers of *Culicoides* in experiments with sheep. *Journal of Entomological Research Society*, 54, 816-818.

Jones, R.H. y Foster, N.M. (1978) Heterogeneity of *Culicoides variipennis* field populations to oral infection with Bluetongue virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27, 178-183.

Kärber, G. (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmkologischer Reihenversuche. *Archiv fur Experimentelle Patologie Pharmakologie*, 162, 480-483.

Kelson, R.V., Colwell, A.E. y McClusky, D.K. (1980) Studies of *Culicoides occidentalis* at Borax lake, California. *Proceedings and papers of the forty-eighth annual conference of the California Mosquito and Vector Control Association, Inc.* [ed. by Grant, C.D.], 130-135.

Kettle, D.S. y Lawson, J.W. (1952) The early stages of British biting midges *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) and allied genera. *Bulletin of Entomological Research*, 43, 421-473.

Kline, D.L., Kelly, J.F. y Ellis, E.A. (1985) A nosema-type microsporidian infection in larvae of *Culicoides* spp. from salt marshes in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology*, **45**, 60-65.

Kline, D.L. y Roberts, R.H. (1981) Effectiveness of chloropyrifos, fenthion, malation, and proporxur as screen treatments for control of *Culicoides mississippiensis*. *Journal Econom Entomology*, **74**, 331-333.

Knudson, D.L. y Shope, R.E. (1985) Overview of the Orbiviruses. *Progress in Clinical and Biological Research*, **178**, 255-266.

Koumbati, M., Managa, O., Nimikou, K., Mellor, P.S. y Papadopoulos, O. (1999) Duration of Bluetongue viremia and serological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats. *Veterinary Microbiology*, **64** (4), 277-285.

Kramer, W.I., Jones, R.H., Holbrook, F.R., Walton, T.E. y Calisher, C.H. (1990) Isolation of arboviruses from *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Colorado during an epizootic of vesicular stomatitis New Jersey. *Journal of Medical Entomology*, **27**, 487-493.

Liebisch, G. y Liebisch, A. (2008) Efficacy of flectron-eartags (cypermethrin) for control of midges (*Culicoides*) as the vectors of Bluetongue virus in cattle: Field studies and biossays. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **115**, 220-230.

Linley, J.R. (1985) Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of nonviral animal pathogens. *Journal of Medical Entomology*, **22**, 589-599.

Lloyd, A., Kline, D., Hogsette, J., Kaufman, P. y Allan, S. (2008) Evaluation of two commercial traps for the collection of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, **24**, 253-262.

Lorca, C., Pujols, J., Arenas, A., Gómez-Guillamón, F., Zorrilla, I., Domingo, M., Arenas-Montés, A., Ruano, M.J. y García-Bocanegra, I. (2011) Epidemiological surveillance of Bluetongue virus serotypes 1, 4 and 8 in Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) in southern Spain. *Veterinary Microbiology*, **149**, 230-235.

Losson, B., De Dekken, R., Fassote, C., Delécolle, J.C., Baldet, T. y Haubruge, E. (2007) Biting midges overwintering in Belgium. *Veterinary Record*, **160** (13), 451-452.

Lysyk, T.J. (2007) Seasonal abundance, parity and survival of adult *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Southern Alberta, Canada, *Journal of Medical Entomology*, **44** (6), 959-969.

Lysyk, T.J. y Danyk, T. (2007) Effect of temperature on life history parameters of adult *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in relation to geographic origin and vectorial capacity for Bluetongue virus. *Journal of Medical Entomology*, **44**, 741-751.

Maan, S., Maan, N.S., Nomikou, K., Batten, C., Antony, F., Belaganahalli, M.N., Samy, A.M., Reda, A.A., Al-Rashid, S.A. y El Batel, M. (2011) Novel Bluetongue virus serotype from Kuwait. *Emerging Infectious Diseases*, **17** (5), 885-889.

MacLachlan, N.J. (1994) The pathogenesis and immunology of Bluetongue virus infection of ruminants. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **17**, 197-206.

MacLachlan, N.J., Barratt-Boyes, S.M., Brewer, A.W. y Stott, J.L. (1991) Bluetongue virus infection of cattle. *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses*, 17-21.

MacLachlan, N.J., Jagels, G., Rossitto, P.V., Moore, P.F. y Heidner, H.W. (1990) The pathogenesis of experimental Bluetongue virus infection of calves. *Veterinary Pathology Online*, **27**, 223. DOI: 10.1177/030098589002700402.

Maia, M.F. (2009) Impact of insecticide-treated nets protecting cattle in zero-grazing units on nuisance and biting insects in the forest region of Kumasi, Ghana. *Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin*, Tesis.

Mands, V., Kline, D.L. y Blackwell, A. (2004) *Culicoides* midge trap enhancement with animal odour baits in Scotland. *Medical and Veterinary Entomology*, **18**, 336-342.

Manso Ribeiro, J. y Noronha, F. (1958) Fièvre catarrhale du mouton au Portugal (Blue Tongue). *Bulletin De l'Office International Des Epizooties*, **50**, 46–64.

McAlpine, J.F., Peterson, B.V., Shewell, G.E., Teskey, H.J., Vockeroth, J.R. y Wood, D.M. (1981) Manual of Nearctic Diptera. Ed. *Research Branch, Agriculture Canada*.

Mehlhorn, H., Schmahl, G., D'Haese, J. y Schumacher, B. (2008b) Butox® 7.5 pour on: A deltamethrin treatment of sheep and cattle: Pilot study of killing effects on *Culicoides* species (Ceratopogonidae). *Parasitology Research*, **102**, 515-518.

Mehlhorn, H., Schmahl, G., Schumacher, B., D'Haese, J., Walldorf, V. y Klimpel, S. (2008c) Effects of bayofly™ on specimens of *Culicoides* species when incubated in hair taken from the feet of previously treated cattle and sheep. *Parasitology Research*, **102**, 519-522.

Mehlhorn, H., Walldorf, V., Klimpel, S., Jahn, B., Jaeger, F., Eschweiler, J., Hoffmann, B. y Beer, M. (2007) First occurrence of *Culicoides obsoletus*-transmitted Bluetongue virus epidemic in central Europe. *Parasitology Research*, **101**, 219-228.

Mehlhorn, H., Walldorf, V., Klimpel, S., Schaub, G., Kiel, E., Focke, R., Liebisch, G., Liebisch, A., Werner, D. y Bauer, C. (2009) Bluetongue disease in Germany (2007–2008): Monitoring of entomological aspects. *Parasitology Research*, **105**, 313-319.

Mehlhorn, H., Walldorf, V., Klimpel, S. y Schmahl, G. (2008) Outbreak of bluetongue disease (BTD) in Germany and the danger for Europe. *Parasitology Research*, **103** (1), 79-86.

Meiswinkel, R. (1995) Afrotropical *Culicoides*: Biosystematics of the Imicola group, subgenus *Avaritia* (diptera: Ceratopogonidae), with special reference to the epidemiology of African Horse Sickness. Ed. *Universiteit van Pretoria*

Meiswinkel, R., Baldet, T., De Dekken, R., Takken, W., Delécolle, J.C. y Mellor, P.S. (2008) The 2006 outbreak of Bluetongue in northern Europe "The entomological perspective". *Preventive Veterinary Medicine*, **87**, 55-63.

Meiswinkel, R., Baylis, M. y Labuschagne, K. (2000) Stabling and the protection of horses from *Culicoides bolitinos* (Diptera: Ceratopogonidae), a recently identified vector of African Horse Sickness. *Bulletin of Entomological Research*, **90**, 509-515.

Meiswinkel, R., Goffredo, M., Leijds, P. y Conte, A. (2008) The *Culicoides* ‘snapshot’: A novel approach used to assess vector densities widely and rapidly during the 2006 outbreak of Bluetongue (BT) in the Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine*, **87**, 98-118.

Meiswinkel, R., Gomulski, L., Delécolle, J., Goffredo, M. y Gasperi, G. (2004) The taxonomy of *Culicoides* vector complexes—unfinished business. *Veterinaria Italiana*, **40** (3), 151-159

Meiswinkel, R., Nevill, E.M., Venter, G.J., Coetzer, J.A., Thomson, G.R. y Tustin, R.C. (1994) Vectors: *Culicoides* species. En: *Infectious Diseases of Livestock, with Special Reference to Southern Africa*. 68-69. (Ed. J.A.W. Coetzer y R.C. Tustin) Oxford University Press, Cape Town.

Meiswinkel, R., van Rijn, P., Leijds, M. y Goffredo, M. (2007) Potential new *Culicoides* vector of Bluetongue virus in northern Europe. *Veterinary Record*, **161**, 564-565.

Meiswinkel, R., Venter, G.J. y Nevill, E.M. (2004) Vectors: *Culicoides* spp. En: *Infectious Diseases of Livestock*, 93–136 (ed. by J.A.W. Coetzer & R.C. Tustin), Oxford University Press, Cape Town.

Mellor, P.S. (1992) *Culicoides* as potential orbivirus vectors in Europe. En: *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses*. (Ed. por E. Walton y B.I. Osburn), 278-283. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

Mellor, P.S. (2004) Environmental influences on arbovirus infections and vectors. En: *Microbe-Vector Interactions in Vector-Borne Diseases*, (Ed. por A. Osbourn), 181-198. Cambridge University Press.

Mellor, P.S. (2004b) Infection of the vectors and Bluetongue epidemiology in Europe. *Veterinaria Italiana*, **40**, 167–174.

Mellor, P.S., Boned, J., Hamblin, C. y Graham, S. (1990) Isolations of African Horse Sickness virus from vector insects made during the 1988 epizootic in Spain. *Epidemiology and Infection*, **105**, 447-454.

Mellor, P.S. y Boorman, J. (1995) The transmission and geographical spread of African Horse Sickness and Bluetongue viruses. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **89**, 1-15.

Mellor, P.S., Boorman, J. y Baylis, M. (2000) *Culicoides* biting midges: Their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology*, **45**, 307-340.

Mellor, P.S., Boorman, J.P.T., Wilkinson, P.J. y Martínez-Gómez, F. (1983) Potential vectors of Bluetongue and African Horse Sickness viruses in Spain. *Veterinary Record*, **112**, 229-230.

Mellor, P.S., Carpenter, S. y White, D.M. (2009) Bluetongue virus in the insect host. En: *Bluetongue. Biology of Animal Infections* (Ed. por P. Mellor, M. Baylis y P. Mertens) 295-320. Elsevier Academic Press, London, United Kingdom.

Mellor, P.S., Carpenter, S. y White, D.V. (2009) Bluetongue virus in the insect host. En: *Bluetongue* (Ed. por P. Mellor, M. Baylis y P. Mertens), 295-320. Elsevier, London.

Mellor, P.S., Carpenter, S., Harrup, L., Baylis, M. y Mertens, P.P. (2008) Bluetongue in Europe and the Mediterranean Basin: History of occurrence prior to 2006. *Preventive Veterinary Medicine*, **87**, 4-20.

Mellor, P.S. y Leake, C.J. (2000) Climatic and geographic influences on arboviral infections and vectors. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Épizooties*, **19**, 41-54.

Mellor, P.S., Jennings, D.M., Wilkinson, P.J. y Boorman, J. (1985) *Culicoides imicola* : A Bluetongue virus vector in Spain and Portugal. *Veterinary Record*, **116**, 589-590.

Mellor, P.S. y Pitzolis, G. (1979) Observation on breeding sites and light trap collections of *Culicoides* during an outbreak of bluetongue in Cyprus. *Bulletin of Entomological Research*, **69**, 229-234.

Mellor, P.S., Rawlings, P., Baylis, M. y Wellby, M.P. (1998) Effect of temperature on AHS virus infection on *Culicoides*. *Archives of Virology*, **14**, 155-163.

Mellor, P.S. y Woolhouse, M.E.J. (2002) Bluetongue virus in the Mediterranean basin 1998-2001. *The Veterinary Journal*, **164**, 20-37.

Mertens, P.P.C., Ross-Smith, N., Diprose, J. y Attoui, H. (2009) The structure of Bluetongue virus core and proteins. En: *Bluetongue. Biology of Animal Infections* (Ed. por P. Mellor, M. Baylis y P. Mertens), 101-125. Elsevier Academic Press, London, United Kingdom.

Metcalf, H.E. y Luedke, A.J. (1980) Epizootiology of Bluetongue in the United States of America. *Bulletin De l'Office International Des Epizooties*, **92**, 507-513.

Miranda, M.A., Borràs, D., Rincón, C. y Alemany, A. (2003) Presence in the Balearic Islands (Spain) of the midges *Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus* group. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**, 52-54.

Miranda, M.A., Borràs, D. y Rincón, C. (2004) Seasonal abundance of *Culicoides imicola* and *C. obsoletus* group in the Balearic Islands (Spain). *Veterinaria Italiana*, **40**, 292-295.

Mullens, B.A. (1993) In vitro assay for permethrin persistence and interference with bloodfeeding of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) on animals. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **9**, 256-259.

Mullens, B.A., Gerry, A.C., Lysyk, T.J. y Schmidtman, E.T. (2004) Environmental effects on vector competence and virogenesis of Bluetongue virus in *Culicoides*: interpreting laboratory data in a field context. *Veterinaria Italiana*, **40**, 160-166.

- Mullens, B.A., Tabachnick, W.J., Holbrook, F.R. y Thompson, L.H. (1995) Effects of temperature on virogenesis of Bluetongue virus serotype 11 in *Culicoides variipennis sonorensis*. *Medical and Veterinary Entomology*, **9**, 71-76.
- Mullens, B.A., Velten, R.K. y Federici, B.A. (1999) Iridescent virus infection in *Culicoides variipennis sonorensis* and interactions with the mermithid parasite *Heleidomermis magnapapula*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **73**, 231-233.
- Mullens, B.A., Velten, R.K., Gerry, A.C., Braverman, Y. y Endris, R.G. (2000) Feeding and survival of *Culicoides sonorensis* on cattle treated with permethrin or pirimiphos-methyl. *Medical and Veterinary Entomology*, **14**, 313-320.
- Muller, M.J., Standfast, H.A., St George, T.D. y Cybinski, D.H. (1982) *Culicoides brevitarsis* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of arboviruses in Australia. *Proceedings of the Third Symposium of Arbovirus Research in Australia* (Ed. por T.D. St George y B.H. Kay), 43-49. Queensland Institute of Medical Research, Brisbane.
- Murray, M.D. (1987) Local dispersal of biting-midge *Culicoides brevitarsis* kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) in south-eastern Australia. *Australian Journal Zoology*, **35**, 559-73.
- Napp, S., Allepuz, A., Alba, A. y Casal, J. (2009) Introduction of infected *Culicoides* by means of transport or commodities. *Revue d'Élevage Et De Médecine Vétérinaire Des Pays Tropicaux*, **62**, 112.
- Nevill, E.M. (1967) Biological studies on some South African *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) and the morphology of their immature stages. Tesis Universiteit van Pretoria.
- Nevill, E.M. (1971) Cattle and *Culicoides* biting midges as possible overwintering hosts of Bluetongue virus. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **38**, 65-72.
- Nevill, E.M. y Anderson, D. (1972) Host preferences of *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) in South Africa as determined by precipitin tests and light trap catches. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **39**, 147-152.

Nevill, E.M., Erasmus, B.J. y Venter, G.J. (1992a) A six-year survey of viruses associated with *Culicoides* biting midges throughout South Africa (Diptera: Ceratopogonidae). *Bluetongue, African Horse Sickness and, Related Orbiviruses*. (Ed. por T.E. Walton y B.I. Osburn), 314-319. CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida.

Nevill, E.M., Venter, G.J. y Edwardes, M. (1992b) Potential *Culicoides* vectors of livestock orbiviruses in South Africa. *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses* (Ed. por T.E. Walton y B.I. Osburn), 306–314. CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida.

Nie, W.Z., Li, J.C., Li, D.X. y Gratz, N. (2005) A preliminary report of introduced living biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) found on entry ships arriving at Qinhuangdao port, China, **56**, 359-361.

Nielsen, B.O., Nielsen, S.A. y Jespersen, J.B. (1988) The fauna of Diptera visiting tethered heifers in Danish pastures. *Entomologiske Meddelelser*, **56**, 79-88.

Nolan, D.V., Carpenter, S., Barber, J., Mellor, P.S., Dallas, J.F., Mordue Luntz, A.J. y Piertney, S.B. (2007) Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of Bluetongue virus in Europe. *Veterinary Microbiology*, **124**, 82-94.

OIE. (1998) Bluetongue in Greece: Confirmation of diagnosis. *Disease Information*, **11**, 166-167.

OIE. (2005) Bluetongue in Spain: Virus detection in cattle. *Disease Information*, **18**, 213-214.

OIE (2006) Bluetongue detected for the first time in Northern Europe. http://www.oie.int/eng/press/en_060823.htm

OIE (2009) Health in the World. (<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal>)

Ortega, M.D., Mellor, P.S., Rawlings, P. y Pro, M.J. (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*, **14**, 85-91.

Osburn, B.I. (1994) The impact of Bluetongue virus on reproduction. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **17**, 189-196.

Osmani, A., Murati, B., Kabashi, Q., Goga, I., Berisha, B., Wilsmore, A.J. y Hamblin, C. (2006) Evidence for the presence of Bluetongue virus in Kosovo between 2001 and 2004. *Veterinary Record*, **158**, 393-396.

Paine, E.O. y Mullens, B.A. (1994) Distribution, seasonal occurrence, and patterns of parasitism of *Heleidomermis magnapapula* (Nematoda: Mermithidae), a parasite of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) in California. *Environmental Entomology*, **23**, 154-160.

Patakakis, M.J. (2004) *Culicoides imicola* in Greece. *Veterinaria Italiana*, **40** (3), 232-234.

Paweska, J.T., Venter, G.J. y Mellor, P.S. (2002) Vector competence of South African *Culicoides* species for Bluetongue virus serotype 1 (BTV-1) with special reference to the effect of temperature on the rate of virus replication in *C. imicola* and *C. bolitinos*. *Medical and Veterinary Entomology*, **16**, 10-21.

Perry, J.N., Wall, C. y Greenway, A.R. (1980) Latin square designs in field experiments involving insect sex attractants. *Ecological Entomology*, **5**, 385-396.

Poinar, G. y Sarto i Monteys, V. (2008) Mermithids (Nematoda: Mermithidae) of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): *Heleidomermis cataloniensis* n. sp. from *Culicoides circumscriptus* Kieffer in Spain and a species of *Cretacimermis* Poinar, 2001 from a ceratopogonid in Burmese amber. *Systematic Parasitology*, **69**, 13-21.

Poinar, G.O. y Mullens, B.A. (1987) *Heleidomermis magnapapula* (Mermithidae: Nematoda) parasitizing *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) in California. *Revue of Nematology*, **10**, 387-391.

Porter, J.E. (1959) Some effects of screens in retarding entry of the common salt-marsh sand fly *Culicoides furens* (Poey) (Diptera: Heleidae). *Mosquito News*, **19**, 159–163.

Purse, B.V., Mellor, P.S., Rogers, D.J., Samuel, A.R., Mertens, P.P. y Baylis, M. (2005) Climate change and the recent emergence of Bluetongue in Europe. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 171-181.

RASVE. (2012) Programa Lengua azul. *Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

RASVE. (2010) Programa Nacional de Erradicación de Lengua Azul. *Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

Rawlings, P. (1996) 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

Rawlings, P. y Mellor, P.S. (1994) African Horse Sickness and the overwintering of *Culicoides* spp. in the Iberian Peninsula. *Revue Scientifique Et Technique De l'Office International Des Epizooties*, **13**, 753-761.

Rawlings, P., Snow, W.F., Boorman, J., Denison, E., Hamblin, C. y Mellor, P.S. (1998) *Culicoides* in relation to transmission of African Horse Sickness virus in the Gambia. *Medical and Veterinary Entomology*, **12**, 155-159.

Raymond, M. (1985) Presentation d'un programme basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cahiers ORSTOM, Série Entomologie Medical et Parasitologie*, **23**, 117-121.

Reisen, W.K. (1989) Estimation of vectorial capacity: Introduction. *Bulletin of the Society of Vector Ecology*, **14**, 39-40.

Rieb, J.P. (1982) Contribution à la connaissance de l'écologie et de la biologie des cératopogonidés (Diptera: Nematocera). Tesis. Université Louis Pasteur de Strasbourg.

Rieb, J.P., Mialhe, E. y Quiot, J.M. (1982) Ceratopogonidae larvae infected by an iridovirus. *Mosquito News*, **42**, 529.

Riegler, L. (2002) Variation in African Horse Sickness virus and its effect on the vector competence of *Culicoides* biting midges. Tesis. University of Surrey, Guildford, UK.

Riek, R.F. (1954) Studies on allergic dermatitis (Queensland itch) of the horse: The aetiology of the disease. *Australian Journal of Agricultural Research*, **5**, 109-129.

Roeder, P.L., Taylor, W.P., Roberts, D.H., Wood, L., Jeggo, M.H., Gard, G.P., Corteyn, M. y Graham, S. (1991) Failure to establish congenital Bluetongue virus infection by infecting cows in early pregnancy. *Veterinary Record*, **128**, 301-304

Rohrmann, K.M.A. (2010) The effectiveness of insecticide-treated nets for the protection of cattle from biting midges and insect pests on dairy cattle farms. Tesis. Freie Universität Berlin, Germany.

Ronderos, M. (1999) Las sensilas antenales y palpaes de la hembra de *Culicoides insignis* (Lutz, 1913) (Diptera: Ceratopogonidae) a la luz del microscopio electrónico de barrido. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biología)*, **95**, 139-146.

Ross-Smith, N., Darpel, K.E., Monaghan, P. y Mertens, P.P.C. (2009) Bluetongue virus: Cell biology. En: *Bluetongue: Biology of Animal Infections* 77-94. Elsevier Academic Press, London, United Kingdom.

Ruiz-Fons, F., Reyes-García, A.R., Alcaide, V. y Gortázar, C. (2008) Spatial and temporal evolution of Bluetongue virus in wild ruminants, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, **14** (6), 951-953.

Sabirovic, M., Roberts, H., Papadopoulou, C., López, M., Hancock, R. y Calistri, P. (2009) International disease monitoring, July to September 2009. *Veterinary Record*, **165**, 552-555.

Saegerman, C., Berkvens, D. y Mellor, P.S. (2008) Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerging Infectious Diseases*, **14**, 6-539.

Sarto i Monteys, V., Ventura, D., Pagès, N., Aranda, C. y Escosa, R. (2005) Expansion of *Culicoides imicola*, the main Bluetongue virus vector in Europe, into Catalonia, Spain. *Veterinary Record*, **156**, 415-415.

Sarto i Monteys, V. y Saiz-Ardanaz, M. (2003) *Culicoides* midges in Catalonia (Spain), with special reference to likely Bluetongue virus vectors. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**, 288-293.

Satta, G., Goffredo, M., Sanna, S., Vento, L., Cubeddu, G.P. y Mascherpa, E. (2004) Disinfestation test against *Culicoides* in north-west Sardinia. *Veterinaria Italiana*, **40**, 329-335.

Savini, G., Goffredo, M., Monaco, F., Di Gennaro, A., Cafiero, M., Baldi, L., De Santis, P., Meiswinkel, R. y Caporale, V. (2005) Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Veterinary Record*, **157**, 133-139.

Savini, G., Maclachlan, N.J., Sanchez-Vizcaíno, M.J. y Zientara, S. (2008) Vaccines against Bluetongue in Europe. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, **31**, 101-120.

Schmahl, G., Klimpel, S., Walldorf, V., Schumacher, B., Jatzlau, A., Al-Quraishy, S. y Mehlhorn, H. (2009) Effects of permethrin (flypor®) and fenvalerate (acadrex® 60, arkofly®) on *Culicoides* species—the vector of Bluetongue virus. *Parasitology Research*, **104**, 815-820.

Schmahl, G., Sven, K., Walldorf, V., Al-Quraishi, S., Schumacher, B., Jatzlau, A. y Melhorn, H. (2008) Pilot study on deltamethrin treatment (butox© 7.5, versatrine©) of cattle and sheep against midges (*Culicoides* species, ceratopogonidae). *Parasitology Research*. **104** (4), 809-813.

Schwartz-Cornil, I., Mertens, P.P., Contreras, V., Hemati, B., Pascale, F., Breard, E., Mellor, P.S., MacLachlan, N.J. y Zientara, S. (2008) Bluetongue virus: Virology, pathogenesis and immunity. *Veterinary Research*, **39** (5) pp. 46.

Sellers, R.F. (1980) Weather, host and vector - their interplay in the spread of insect borne animal virus diseases. *Journal of Hygiene*, **81**, 189-196.

Sellers, R.F. (1991) Weather, *Culicoides*, and the distribution and spread of Bluetongue and African Horse Sickness viruses. En: *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orviruses* (Ed. T.E. Walton y B.I. Osburn) 284, 290. CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida.

Sellers, R.F., Pedgley, D.E. y Tucker, M.R. (1978) Possible windborne spread of Bluetongue to Portugal, June-July 1956. *The Journal of Hygiene*, **81**, 189-196.

Service, M.W. (1969) Studies on the biting habits of *Culicoides impunctatus* Goetghebuer, *C. obsoletus* (Meigen) and *C. punctatus* (Meigen) (Diptera: Ceratopogonidae) in southern England. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology*, **44**, 1-10.

Smith, H. y Mullens, B.A. (2003) Seasonal activity, size, and parity of *Culicoides occidentalis* (Diptera: Ceratopogonidae) in a coastal southern California salt marsh. *Journal of Medical Entomology*, **40**, 352-355.

Snedecor, G.W. y Cochran, W.G. (1980) Statistical methods. Iowa State University Press *7th Edition*,

Spreull, J. (1905) Malarial catarrhal fever (Bluetongue) of sheep in South Africa. *Journal of Comparative Pathology*, **18**, 321-337.

Standfast, H.A., Muller, M.J. y Wilson, D.D. (1984) Mortality of *Culicoides brevitarsis* (Diptera: Ceratopogonidae) fed on cattle treated with ivermectin. *Journal of Economic Entomology*, **77**, 419-421.

Stendel, W., Hamel, H.D., Sieveking, H.U. y Brühne, D. (1992) Analytical determination of the distribution of flumethrin on the body surface of cattle following topical pour-on application. *Veterinary Parasitology*, **42**, 137-143.

Stephan, A., Clausen, P.H., Bauer, B. y Steuber, S. (2009) PCR identification of *Culicoides dewulfi* midges (Diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of Bluetongue in Germany. *Parasitology Research*, **105**, 367-371.

Strong, L. (1992) Avermectins: A review of their impact on insects of cattle dung. *Bulletin of Entomological Research*, **82**, 265-274.

Tabachnick, W.J. (2004) *Culicoides* and the global epidemiology of Bluetongue virus infection. *Veterinaria Italiana*, **40** (3), 145-150.

Tabachnick, W.J. (1991) Genetic control of oral susceptibility to infection of *Culicoides variipennis* with Bluetongue virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **45**, 666-671

Takahashi, K., Yagi, K. y Hattori, K. (1985) The effects of two insect growth regulators on the biting midges, *Culicoides circumscriptus* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae). *Japanese Journal of Sanitary Zoology*, **36**, 353-355.

Taylor, L.R. (1962) The absolute efficiency of insect suction traps. *Annals of Applied Biology*, **50**, 405-421.

Taylor, W.P. (1986) The epidemiology of Bluetongue. *Revue Scientifique Et Technique De l'Office International Des Epizooties*, **5**, 351-356.

Thiry, E., Saegerman, C., Guyot, H., Kirten, P., Losson, B., Rollin, F., Bodmer, M., Czaplicki, G., Toussaint, J.F. y De Clercq, K. (2006) Bluetongue in northern Europe. *Veterinary Record*, **159** (10), 327.

Tiawsirisup, S., Nithiuthai, S. y Kaewthamasorn, M. (2007) Repellent and adulticide efficacy of a combination containing 10% imidacloprid and 50% permethrin against *Aedes aegypti* mosquitoes on dogs. *Parasitology Research*, **101**, 527-531.

Trigg, J.K. (1996) Evaluation of eucalyptus-based repellent against *Culicoides impunctatus* (Diptera: ceratopogonidae) in Scotland. *Journal of American Mosquito Control Association*, **12**, 329-330.

Vanbinst, T., Vandebussche, F., Vandemeulebroucke, E., De Leeuw, I., Deblauwe, I., De Deken, G., Madder, M., Haubruge, E., Losson, B. y De Clercq, K. (2009) Bluetongue virus detection by real-time RT-PCR in *Culicoides* captured during the 2006 epizootic in Belgium and development of an internal control. *Transboundary and Emerging Diseases*, **56**, 170-177.

Venail, R., Mathieu, B., Setier-Rio, M.L., Borba, C., Alexandre, M., Viudes, G., Garros, C., Allene, X., Carpenter, S. y Baldet, T. (2011) Laboratory and field-based tests of deltamethrin insecticides against adult *Culicoides* biting midges. *Journal of Medical Entomology*, **48**, 351-357.

Venter, G.J. (2007) The oral susceptibility of South African livestock-associated *Culicoides* species to selected orbiviruses. Tesis. Universiteit van Pretoria.

Venter, G.J., Labuschagne, K., Hermanides, K.G., Boikanyo, S.N.B., Majatladi, D.M. y 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**, 299-307.

Venter, G.J. y Meiswinkel, R. (1994) The virtual absence of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in a light-trap survey of the colder, high-lying area of the eastern Orange Free State, South Africa, and implications for the transmission of arboviruses. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **61** (4), 327-340.

Venter, G.J., Meiswinkel, R., Nevill, E.M. y Edwardes, M. (1996) *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) associated with livestock in the Onderstepoort area, Gauteng, South Africa as determined by light-trap collections. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **63**, 315-325.

Venter, G.J. y Paweska, J.T. (2007) Virus recovery rates for wild-type and live-attenuated vaccine strains of African Horse Sickness virus serotype 7 in orally infected South African *Culicoides* species. *Medical and Veterinary Entomology*, **21**, 377-383.

Venter, G.J., Koekemoer, J.J.O. y Paweska, J.T. (2006) Investigations on outbreaks of African Horse Sickness in the surveillance zone of South Africa. *Revue scientifique et technique, Office International des Epizooties*, **25**, 1097-1019.

Venter, G.J., Paweska, J.T., Lunt, H., Mellor, P.S. y Carpenter, S. (2005) An alternative method of blood-feeding *Culicoides imicola* and other haematophagus *Culicoides* species for vector competence studies. *Veterinary Parasitology*, **131**, 331–335.

Venter, G.J., Paweska, J.T., van Dijk, A.A., Mellor, P.S. y Tabachnick, W.J. (1998) Vector competence of *Culicoides bolitinos* and *C. imicola* for South African Bluetongue virus serotype 1, 3 and 4. *Medical and Veterinary Entomology*, **12**, 378-385.

Venter, G.J., Wright, I.M., del Río, R., Lucientes, J. y Miranda, M.A (2010) The susceptibility of *Culicoides imicola* and other South African livestock-associated *Culicoides* species to infection with Bluetongue virus serotype 8. *Medical and Veterinary Entomology*, **25** (3), 320-326

Verwoerd, D.W. y Erasmus, B.J. (2004) Bluetongue. En: *Infectious diseases of livestock* (Ed. por J.A.W. Coetzer, y R.C Tustin), 1201-1220. Oxford University Press Southern Africa.

Walker, A.R. (1977) Seasonal fluctuations of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in Kenya. *Bulletin of Entomological Research*, **67**, 217-233

Wall, C. y Perry, J.N. (1980) Effects of spacing and trap number on interactions between pea moth pheromone traps. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, **28**, 313-321.

Walter, S. D., Hildreth, S. W. y Beaty, B. J. (1980) Estimation of infection rates in populations of organisms using pools of variable size. *American Journal of Epidemiology*, **112**, 124–128.

Walton, T.E. (2004) The history of Bluetongue and a current global overview. *Veterinaria Italiana*, **40**, 31–38.

Walton, T.E. y Osburn, B.I. (1992) Bluetongue, African Horse Sickness, and Related Orbiviruses (Ed. T.E. Walton y B.I. Osburn), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.

Ward, M.P. (1994) The epidemiology of Bluetongue virus in Australia – a review. *Australian Veterinary Journal*, **71**, 3–7.

WHO (1967) Arboviruses and human disease. *World Health Organization*. Technical Report Series, n. 369.

WHO (1981) Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult blackflies, sandflies and biting midges to insecticides: Mimeographed document (WHO/VBC/ 81.810). *World Health Organization*, Geneva, Switzerland.

Wilbur, L.A., Evermann, J.F., Levings, R.L. y Stoll, I.R. (1994) Regulatory-abortion and death in pregnant bitches associated with a canine vaccine contaminated with Bluetongue virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **204**, 1762-1762.

Wilson, A., Carpenter, S., Gloster, J. y Mellor, P. (2007) Re-emergence of Bluetongue in northern Europe in 2007. *Veterinary Record*, 41:35.

Wittman, E.J., Mellor, P.S. y Baylis, M. (2002) Effect of temperature on the transmission of arboviruses by the biting midge, *Culicoides sonorensis*. *Medical and Veterinary Entomology*, **16**, 147-156.

Wittmann, E.J. (2000) Temperature and the Transmission of Arboviruses by *Culicoides* Biting Midges, Tesis. University of Bristol, UK.

Wittman, J., Mellor, P.S. y Baylis, M. (2001) Using climate data to map the potential distribution on *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in Europe. *Revue Scientifique Et Technique De l'Office International Des Epizooties*, **20**, 731-740.

Wright, P.J. y Easton, C.S. (1996) Natural incidence of *Lagenidium giganteum* couch (Oomycetes: Lagenidiales) infecting the biting midge *Culicoides molestus* (Skuse) (Diptera: Ceratopogonidae). *Australian Journal of Entomology*, **35**, 131-134.

Zimmer, J.Y., Losson, B., De Dekken, R. y Fassote, C. (2008) Breeding sites of Bluetongue vectors in northern Europe. *Veterinary Record*, **162**,131.

9. ANEXO

9.1 Manuscrito I

Recovery rates of bluetongue virus serotype -1, -2, -4 and -8 Spanish strains from orally infected *Culicoides imicola* in South Africa

del Río R., Miranda M.A., Paredes-Esquivel C., Lucientes J., Calvete C., Estrada R. y Venter G.J.

Medical and Veterinary Entomology, (2012) **26**, 162-167



Recovery rates of bluetongue virus serotypes 1, 2, 4 and 8 Spanish strains from orally infected *Culicoides imicola* in South Africa

R. DEL RIO LÓPEZ¹, M. A. MIRANDA¹, C. PAREDES-ESQUIVEL¹, J. LUCIENTES², C. CALVETE³, R. ESTRADA² and G. J. VENTER^{4,5}

¹Laboratory of Zoology and Emerging Diseases, University of the Balearic Islands (UIB-IUNICS), Palma de Mallorca, Spain,

²Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Science, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain, ³Unit of Animal

Health and Production, Centre for Agricultural Food Technology and Research [Centro de Investigación y Tecnología

Agroalimentaria (CITA)], Zaragoza, Spain, ⁴Parasites, Vectors and Vector-Borne Diseases, Agricultural Research

Council-Onderstepoort Veterinary Institute, Onderstepoort, South Africa and ⁵Department of Veterinary Tropical Diseases,

University of Pretoria, Onderstepoort, South Africa

Abstract. Bluetongue (BT) is an infectious disease of ruminants that has spread northwards in Europe during the last decade. The aetiological agent of the disease is an arbovirus [bluetongue virus (BTV)] that belongs to the genus *Orbivirus* (family Reoviridae). The virus is transmitted by certain species of biting midge within the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). Information on the vector status of the *Culicoides* species in a specific area will be essential to predict the risk for BTV incursion. Field-collected *Culicoides (Avaritia) imicola* Kieffer from South Africa were fed on blood containing several Spanish isolates of BTV. Despite the high virus concentrations in the bloodmeal (5.1–6.4 log₁₀ TCID₅₀/mL of blood), virus was recovered from <1% of midges assayed after incubation. Virus concentrations >2.5 log₁₀ TCID₅₀/midge in individual infected *C. imicola* suggest virus replication with possible risk for transmission to susceptible vertebrate hosts in the field for at least two of the serotypes assayed (BTV-1 and BTV-2). A third serotype (BTV-4) was very close to the estimated threshold for transmission. The relatively low to near refractory status of *C. imicola* compared with other vector species such as *Culicoides bolitinos* supports previous results, indicating that *Culicoides* species other than *C. imicola* may play a more important role in the epidemiology of BTV.

Key words. *Culicoides imicola*, bluetongue virus, infection rate, oral susceptibility, vector capability.

Introduction

Bluetongue (BT) is an infectious viral disease of wild and domestic ruminants that can severely affect domestic sheep and sometimes cattle. The causative agent, bluetongue virus (BTV), genus *Orbivirus*, family Reoviridae (Borden *et al.*, 1971), is transmitted by several *Culicoides* species (Mellor *et al.*, 2000). Before 2000 BTV was believed to be restricted to an area between 40° N and 35° S (Walton, 2004); however,

during the last decade, it has expanded northwards in Europe up to 50° N [Office International des Epizooties (OIE), 2006; Carpenter *et al.*, 2009]. This expansion of the infection and associated vectors has been postulated as partly attributable to climate change (Purse *et al.*, 2005).

Twenty-four BTV serotypes of the virus are recognized worldwide (OIE, 2009). However, recent studies seem to indicate that two more serotypes may be implicated in the epidemiology of the disease (Hofmann *et al.*, 2008;

Correspondence: Ricardo del Rio López, Laboratory of Zoology and Emerging Diseases, UIB-IUNICS, Cra. Valldemossa km 7.5, Palma de Mallorca, Illes Balears 07122, Spain. Tel.: +34 971 173352; Fax: +34 971 173184; E-mail: ricardo.delrio@uib.es

Maan *et al.*, 2011). The first BTV serotype to be recorded in mainland Spain between 1956 and 1960 was BTV-10. The outbreaks that occurred during those years were attributed to infected *Culicoides* transported by wind from North Africa and resulted in the death of more than 100 000 sheep (Campano-López & Sanchez-Botija, 1958; Manso-Ribeiro & Noreña, 1958; Sellers *et al.*, 1978). Forty years later, in October 2000, BTV struck Spain again. The serotype was identified as BTV-2 and caused 305 outbreaks in the Balearic Islands (Miranda *et al.*, 2003). Three years later, BTV-4 was reported in the eastern part of Menorca and in October 2004 in mainland Spain, affecting the province of Cádiz and spreading rapidly northwards and southwards (Gómez-Tejedor, 2004). Despite vaccination with live-attenuated BTV-4 vaccine (Gómez-Tejedor, 2004), this serotype continued to spread northwards during the summer of 2005 into provinces in Andalucía, Castilla la Mancha, Castilla y León, Extremadura and Madrid. In addition, BTV-2 was also isolated from sentinel cattle in Spain in 2005 (Mellor *et al.*, 2008). In 2007, another serotype, BTV-1, appeared for the first time in Andalucía (Allepez *et al.*, 2010) and in 2009 it spread to the northwest, causing 240 outbreaks in cattle and sheep (Sabirovic *et al.*, 2009). In January 2008, BTV-8 occurred in northern Spain and spread to the southern part of the Iberian Peninsula in October the same year (Lorca *et al.*, 2011).

Based on its confirmed vector status and host preference for large livestock, the Afro-Asiatic *Culicoides (Avaritia) imicola* Kieffer is considered to be the principal vector of BTV in South Africa (Nevill *et al.*, 1992a, 1992b; Meiswinkel *et al.*, 2004) and across vast geographic regions of Africa and southern Europe (Mellor *et al.*, 1985, 2000, 2009; Boorman, 1986; Mellor, 1992). The oral susceptibility of *C. imicola* to various strains of BTV has been demonstrated on several occasions in the laboratory (Venter *et al.*, 2010). Field isolations of BTV from this species also support laboratory results (Meiswinkel *et al.*, 2004; Venter *et al.*, 2006).

Distribution and modelling studies of *C. imicola* in Spain showed that outbreaks of BTV in 2007 were almost exclusively restricted to areas with high numbers of this species (Acevedo *et al.*, 2010). Furthermore, about 5% of those localities, where *C. imicola* was predicted to be absent, had experienced at least one outbreak of BTV in the past (Acevedo *et al.*, 2010). In addition, recent studies conducted in Europe associate the transmission of several serotypes of the virus with *Culicoides* species belonging to the Pulicaris and Obsoletus groups (Mellor & Pitzolis, 1979; Ferrari *et al.*, 2005; Savini *et al.*, 2005).

In order to elucidate the role of the proven vector *C. imicola* in the epidemiology of BTV, the oral susceptibility of this species for those BTV serotypes circulating in Spain was determined.

Materials and methods

Viruses and insects

In the absence of either large populations or laboratory colonies of *C. imicola* in Spain, which are necessary for conducting this type of trial, adults of this species were collected in South Africa using the Onderstepoort blacklight

Table 1. Virus serotypes, year of isolation and passage history of Spanish bluetongue virus (BTV) isolates used for the oral infection of field-collected *Culicoides* midges.

Virus serotype	Strain identification	Year of isolation	Passage history*
BTV-1	SPA/07	2007	1, Vero
BTV-2	R23/00	2000	2, BHK-21
BTV-4	SPA/04	2004	3, BHK-21
BTV-8	Segovia	—	2, BHK-21

*Number of passages in baby hamster kidney cells (BHK-21) or Vero cells.

trap as described by Venter *et al.* (1998). Traps were placed close to cattle stabled at the Agricultural Research Council–Onderstepoort Veterinary Institute (25°29' S, 28°11' E; 1219 m a.s.l.) in South Africa.

Field-collected *Culicoides* midges were fed on blood–BTV mixtures between April and May 2009 in nine separate feeding attempts.

The four BTV serotypes responsible for recent outbreaks in Spain (BTV-1, -2, -4 and -8) were obtained from the National Reference Laboratory in Algete, Madrid (Spain). Stocks of virus for infection studies were grown in baby hamster kidney cells (BHK-21). Viruses were titrated and stored as described by Venter *et al.* (1998). The details of each are shown in Table 1.

Feeding technique

After acclimatization in the insectary for 2–3 days at 23.5 °C and 50–70% relative humidity (RH), field-collected midges were held without nutrients or water for 24 h before blood feeding. Five millilitres of stock virus was mixed, immediately before feeding, with 5 mL of blood obtained from a BTV antibody-negative sheep. Sheep used for oral susceptibility studies were kept in insect-free conditions and were monitored daily for disease symptoms in order to prevent any field virus infection of the animals. Flies were fed through 1-day-old chicken skin membrane in batches of 250–300 for 30–45 min on defibrinated blood containing one of the four serotypes (Venter *et al.*, 1998). During feeding, lighting in the room was dimmed to ≈1% daylight (≈65 lux) and the blood–virus mixture was maintained at 35.5 °C and stirred continuously to prevent the settling of blood cells (Venter *et al.*, 1998).

After feeding, midges were immobilized at –20 °C for about a minute. Blood-engorged females were separated out on a chill-table and kept in 250-mL unwaxed paper cups, closed with fine mesh, at 23.5 °C and 50–70% RH at ≈1% daylight for the 10-day extrinsic incubation period. *Culicoides* females were maintained on 5% (w/v) sucrose solution to which, in order to improve their survival rate, 500 IU penicillin, 500 µg streptomycin and 1.25 µg fungizone per mL of solution were added. Females surviving the incubation period were sorted into species on a chill-table and stored individually in 1.5 mL microfuge tubes at –70 °C until assayed.

Processing of *Culicoides* and virological assays

Midges were assayed for virus immediately after feeding (10 blood-engorged midges per feeding attempt) and also after 10 days of extrinsic incubation. Processing of individual midges for microtitration assays was carried out as described by Paweska *et al.* (2002).

The identities of all virus isolates were determined by a microtitre virus-neutralization procedure (House *et al.*, 1990), using type-specific antisera produced in guinea pigs. Virus concentrations were calculated using the method of Kärber (1931). Statistical differences between experimental groups were analysed using chi-squared analysis. *P*-values <0.05 were considered to indicate statistical significance.

Results

Culicoides feeding and survival rates

Feeding rates varied from 10% to 70% and the virus concentrations in bloodmeals ranged from 5.1 log₁₀ TCID₅₀/mL (BTV-2) to 6.4 log₁₀ TCID₅₀/mL (BTV-1) (Table 2). A total of 3573 out of 6063 field-collected midges (58.9%) fed on the four serotypes of BTV survived the 10-day extrinsic incubation period.

Virus recovery in midges

Because of bacterial and fungal contamination, results could not be obtained from midges tested immediately after feeding or from all of the surviving midges assayed after incubation. The number of midges from which results could be obtained is shown in Table 2.

Only three (BTV-1, -2, -4) of the four serotypes used were recovered from *C. imicola* after 10 days at 23.5 °C. The highest virus recovery rate (0.5%) was obtained for BTV-2; recovery rates for BTV-1 and BTV-4 were both 0.2%. No significant difference ($\chi^2 = 2.543$, d.f. = 3, *P* = 0.467) in infection prevalence for the four different serotypes was

Table 2. Virus recovery rates and titres in field-collected *Culicoides imicola*, *Culicoides bolitinos*, *Culicoides enderleini* and *Culicoides nevillei* maintained for 10 days at 23.5 °C after feeding on blood containing different serotypes of bluetongue virus (BTV).

	BTV-1	BTV-2	BTV-4	BTV-8
Virus titre of bloodmeal, log ₁₀ TCID ₅₀ /mL	6.4	5.1	5.8	6.1
<i>C. imicola</i> (%)	1/490* (0.2%)	4/889 (0.5%)	1/404 (0.2%)	0/492 (0.0%)
Mean virus titre, log ₁₀ TCID ₅₀ /midge (range)	3.9	2.5 1.4–3.2	2.4	—
<i>C. bolitinos</i>	0/2	0/2	0/11	0/5
<i>C. enderleini</i>	0/1	—	0/1	0/8
<i>C. nevillei</i>	—	—	—	0/2

*Not positive/not tested.

obtained. All isolates from infected midges were serotyped as identical to those used to spike the blood.

The mean virus titre in infected midges was 2.2 log₁₀ TCID₅₀/midge (range: 1.4–3.9 log₁₀ TCID₅₀/midge). Titres ≥2.5 log₁₀ TCID₅₀/midge were demonstrated for BTV-1 and BTV-2 (Table 2).

Few specimens of *Culicoides (Avaritia) bolitinos* Meiswinkel, *Culicoides (Remia) enderleini* Cornet and Brunhes, and *Culicoides (Remia) nevillei* Cornet and Brunhes survived the 10-day incubation period. No virus was isolated from any of those specimens (Table 2).

Discussion

In the present study, field-collected *Culicoides* midges were not screened for the presence of field viruses. However, virus recovery from field-collected vector populations is generally very low (Chiang & Reeves, 1962; Walter *et al.*, 1980; Gerry *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2006). In a field survey conducted in South Africa (which is endemic for BT) from 1979 to 1985, the virus was isolated from only 526 of 4506 *Culicoides* pools (pool size: 100–100 000 individuals) (Nevill *et al.*, 1992a). At an average of 1000 midges per pool, the field infection prevalence would be 0.06%. The whole of South Africa is endemic for BT, but during the study period no cases of BT were reported. For these reasons it is therefore likely that the infection rate obtained reflects laboratory conditions and that any influence by field infections should be minimal. This is supported by the fact that all serotypes recovered from the midges were identified as those used to spike the bloodmeals.

The infection prevalence obtained (i.e. the percentage of midges from which virus could be recovered after the incubation period) was very low compared with prevalences reported in other susceptibility studies with different strains of the virus, and ranged from 0.0% (BTV-8) to 0.5% (BTV-2). The highest recovery rate (0.5%) was obtained for BTV-2, which was also the serotype with the lowest virus titre in the bloodmeal. Despite the relatively high virus concentration of BTV-8 in the bloodmeal (6.1 log₁₀ TCID₅₀/mL), this serotype was not recovered from the midges after the extrinsic incubation period (Table 2). The fact that BTV-8 was not recovered from *C. imicola* does not necessarily mean that the species is refractive to infection with this serotype. Based on the number of midges assayed, we can conclude that the infection prevalence for this strain was <0.2%. Statistically, the virus recovery rate of BTV-8 was not significantly different from that of the other three serotypes.

Low virus recovery rates, as an indication of vector competence, do not necessarily translate to a low vector capacity for *C. imicola* with the serotypes or strains used. Based on light trap results, *C. imicola* is widespread in South Africa and is found in very high numbers near livestock (Meiswinkel *et al.*, 2004). This super abundance and host preference of *C. imicola* can compensate for the low infection rates observed. Indeed, this species is considered to have the highest vector capacity for orbiviruses in South Africa

(Nevill *et al.*, 1992b; Meiswinkel *et al.*, 2004). Although *C. imicola* in the Mediterranean basin is not as abundant as in Africa, its role as a competent vector for BTV in this area is enhanced by the presence of relatively high numbers of naïve or unvaccinated hosts because vaccination campaigns have not been persistent. Sheep in these regions, therefore, do not develop effective immunocompetent responses to the infection. The higher susceptibility of European breeds of sheep (Erasmus & Potgieter, 2009), compared with South African sheep breeds, may also play a role in the epidemiology of this disease in Europe.

The minimum level of viraemia in a host necessary to infect *Culicoides* vectors is not known. Based on the size of the bloodmeal taken by *C. imicola* (0.01–0.06 µL) (Venter *et al.*, 2005), a minimum of 5.0 log₁₀ TCID₅₀/mL will theoretically ensure that each individual midge will be exposed to approximately one TCID₅₀/bloodmeal. This value does not take into account the elimination of excess liquid taken while feeding. Virus concentrations as low as 2.0 log₁₀ TCID₅₀/mL have been reported as sufficient to produce infection rates of 0.2% in *Culicoides (Avaritia) brevitarsis* Kieffer (Muller *et al.*, 1982), a species similar in size to *C. imicola*. In the U.S.A., Bonneau *et al.* (2002) succeeded in infecting *Culicoides (Monoculicoides) sonorensis* Wirth & Jones by feeding it on a BTV-infected sheep with no detectable viraemia (<0.5 log₁₀ TCID₅₀/mL of blood). It is therefore clear that the virus titres used in the present study (>5.1 log₁₀ TCID₅₀/mL of blood) were more than sufficient to infect all susceptible *Culicoides* and that the infection prevalence obtained is an indication of the susceptibility rate of this *C. imicola* population for the viral strains used.

Some studies show that concentrations of live virus >2.5 log₁₀ TCID₅₀/midge in the midge head or body indicate a fully disseminated infection (Jennings & Mellor, 1987; Fu *et al.*, 1999; Riegler, 2002). This threshold value (2.5 log₁₀ TCID₅₀/midge) was derived from *C. sonorensis* studies and may not be applicable to the interpretation of vector competence results in other *Culicoides* species, such as *C. imicola*. The virus titres recorded in individual infected *C. imicola* in the present study indicate that the virus had replicated in the insect to high levels for two of the serotypes assayed (BTV-1 and BTV-2) and, consequently, onwards transmission to susceptible vertebrate hosts may be possible. A titre of 2.4 log₁₀ TCID₅₀/midge was obtained for BTV-4. This value was very close to the estimated threshold for transmission in *C. sonorensis*. Because *C. imicola* is smaller than *C. sonorensis* and given that this serotype circulated in several outbreaks in Spain in areas in which *C. imicola* was present (Gómez-Tejedor, 2004), it can be postulated that the Spanish strain of BTV-4 may also be transmitted by the South African population of *C. imicola*.

Although the current study indicates a very low vector competence of *C. imicola* for the serotypes used, it also shows that this species is susceptible to infection with these isolates and that onwards transmission is possible. In Europe, *C. imicola* has been recorded in the Iberian Peninsula, the Balearic Islands, Greece, Italy and the south of France and is thought to be the main vector of BTV in those areas

(Goffredo *et al.*, 2001; Miranda *et al.*, 2003; Giovannini *et al.*, 2004; Purse *et al.*, 2005; Sarto i Monteys *et al.*, 2005). Climate change has created milder winter conditions in northern regions and recent studies describe an apparent ongoing range expansion of this species northwards (Mellor & Wittmann, 2002; Calvete *et al.*, 2006). In addition to range expansion, milder conditions can also influence the vector competence of *Culicoides* species, leading to an exponential increase in vector capacity (Mullens *et al.*, 2004).

The relatively low susceptibility results obtained in the present study support the notion that BT may be a multi-vector disease; this will add to the complexity of the epidemiology of BTV.

It should also be noted that the susceptibility of a single *Culicoides* population to infection with different strains of orbivirus may differ significantly over time [e.g. BTV serotypes (Jones & Foster, 1978), African horse sickness virus serotype 7 strains (Venter & Paweska, 2007)]. Field populations of *Culicoides* species can vary broadly in their genetic susceptibility to BTV infection. Indeed, it has been demonstrated that some populations of the same species may be completely refractory to infection by some serotypes (Ward, 1994; Mellor, 2004; Carpenter *et al.*, 2006). True assessment of vector competence may be difficult to calculate as it would require some level of real-time monitoring (e.g. testing local *Culicoides* populations using variants of orbiviruses in current local circulation). Thus, the current study should be repeated with European populations of *C. imicola* and extended to other potential vector species such as those included in the Obsoletus group in order to assay their implication in the epidemiology of BT in places where several species of either proven or suspected and potential vectors are present. The lack of established laboratory colonies of *C. imicola* in Europe, as well as the lower population abundance of this species compared with that in Africa, may represent a serious obstacle to the development of such oral susceptibility trials in southern European countries.

Acknowledgements

This study was partly initiated by the European Union as part of a project entitled 'Surveillance Network of Reoviruses, Bluetongue and African Horse Sickness, in the Mediterranean basin and Europe' (MedReoNet) (contract no. 044285). The authors thank Concepción Gómez Tejedor and Montserrat Agüero (Laboratorio Central de Veterinaria Algete, Algete) for making the Spanish isolates available. We are thankful to Ina Hermanides, Isabel Wright, Daphney Majatladi and Solomon Boikanyo (Oderstepoort Veterinary Institute, Pretoria) for technical assistance. We thank Eva Veronesi (Institute for Animal Health, Pirbright) and Truuske Gerdes (Onderstepoort Veterinary Institute, Pretoria) for constructive comments on earlier drafts of this manuscript. We also would like to thank the Conselleria d'Innovació, Interior i Justícia and the national project 'Estudio de la Competencia Vectorial de las Especies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) Vectores de la Lengua Azul en España y Evaluación de la Hibernación del Virus en los Vectores' for financial support.

References

- Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., Estrada, R., Luz Marquez, A., Angel Miranda, M., Gortazar, C. & Lucientes, J. (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.
- Allepuz, A., García-Bocanegra, I., Napp, S., Casal, J., Arenas, A., Saez, M. & González, M.A. (2010) Monitoring bluetongue disease (BTV-1) epidemic in southern Spain during 2007. *Preventive Veterinary Medicine*, **96**, 263–271.
- Bonneau, K.R., DeMaula, C.D., Mullens, B.A. & MacLachlan, N.J. (2002) Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep. *Veterinary Microbiology*, **88**, 115–125.
- Boorman, J. (1986) Presence of bluetongue virus vectors on Rhodes. *The Veterinary Record*, **118**, 21.
- Borden, E.C., Shope, R.E. & Murphy, F.A. (1971) Physiochemical and morphological relationships of some arthropod-borne viruses to bluetongue virus—a new taxonomic group. Physiochemical and serological studies. *Journal of General Virology*, **13**, 261–271.
- Calvete, C., Miranda, M.A., Estrada, R., Borrás, D., Sarto i Monteys, V. & Collantes, F. (2006) Spatial distribution of *Culicoides imicola*, the main vector of bluetongue virus. *The Veterinary Record*, **158**, 130–131.
- Campano-López, A. & Sanchez-Botija, C. (1958) L'épizootie de fièvre catarrhale ovine en Espagne (bluetongue). *Bulletin de l'Office International des Epizooties*, **50**, 65–83.
- Carpenter, S., Lunt, H.L., Arav, D., Venter, G.J. & Mellor, P.S. (2006) Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *Journal of Medical Entomology*, **43**, 73–78.
- Carpenter, S., Wilson, A. & Mellor, P.S. (2009) *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. *Trends in Microbiology*, **17**, 172–178.
- Chiang, C.L. & Reeves, W.C. (1962) Statistical estimation of virus infection rates in mosquito vector populations. *American Journal of Hygiene*, **75**, 377–391.
- Erasmus, B.J. & Potgieter, C. (2009) The history of bluetongue. *Bluetongue* (ed. by P. Mellor, M. Baylis & P. Mertens), pp. 7–21. Elsevier, London.
- Ferrari, C., De Liberato, C., Scavia, G. *et al.* (2005) Active circulation of bluetongue vaccine virus serotype-2 among unvaccinated cattle in central Italy. *Preventive Veterinary Medicine*, **68**, 103–113.
- Fu, H., Leake, C.J., Mertens, P.P.C. & Mellor, P.S. (1999) The barriers to bluetongue virus infection, dissemination and transmission in the vector, *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Archives of Virology*, **144**, 747–761.
- Gerry, A.C., Mullens, B.A., MacLachlan, N.J. & Mecham, J.O. (2001) Seasonal transmission of bluetongue virus by *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) at a southern California dairy and evaluation of vectorial capacity as a predictor of bluetongue virus transmission. *Journal of Medical Entomology*, **38**, 197–209.
- Giovannini, A., Calistri, P., Conte, A. *et al.* (2004) Bluetongue virus surveillance in a newly infected area. *Veterinaria Italiana*, **40**, 188–197.
- Goffredo, M., Satta, G., Torina, A. *et al.* (2001) The 2000 bluetongue virus (BTV) outbreak in Italy: distribution and abundance of the principal vector *Culicoides imicola* Kieffer. *Proceedings of the 10th International Symposium of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (AAVLD) and OIE Seminar on Biotechnology*, Salsomaggiore, pp. 4–7.
- Gómez-Tejedor, C. (2004) Brief overview of the bluetongue situation in Mediterranean Europe, 1998–2004. *Veterinaria Italiana*, **40**, 57–60.
- Hofmann, M.A., Renzullo, S., Mader, M., Chagnat, V., Worwa, G. & Thuer, B. (2008) Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerging Infectious Diseases*, **14**, 12, 1855–1861.
- House, C., Mikiciuk, P.E. & Berninger, M.L. (1990) Laboratory diagnosis of African horse sickness: comparison of serological techniques and evaluation of storage methods of samples for virus isolation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*, **2**, 44–50.
- Jennings, D.M. & Mellor, P.S. (1987) Variation in the responses of *Culicoides variipennis* (Diptera, Ceratopogonidae) to oral infection with bluetongue virus. *Archives of Virology*, **95**, 177–182.
- Jones, R.H. & Foster, N.M. (1978) Heterogeneity of *Culicoides variipennis* field populations to oral infection with bluetongue virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **27**, 178–183.
- Kärber, G. (1931) Beitrag zur Kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv für Experimentelle Pathologie Pharmakologie*, **162**, 480–483.
- Lorca, C., Pujols, J., Arenas, A. *et al.* (2011) Epidemiological surveillance of bluetongue virus serotypes 1, 4 and 8 in Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) in southern Spain. *Veterinary Microbiology*, **149**, 230–235.
- Maan, S., Maan, N.S., Nomikou, K. *et al.* (2011) Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. *Emerging Infectious Diseases*, **17**, 885–889.
- Manso-Ribeiro, J. & Noreña, F.M.O. (1958) Fiebre catarrhale du mouton au Portugal (bluetongue). *Bulletin de l'Office International des Epizooties*, **50**, 46–64.
- Meiswinkel, R., Venter, G.J. & Nevill, E.M. (2004) Vectors: *Culicoides* spp. *Infectious Diseases of Livestock* (ed. by J.A.W. Coetzer & R.C. Tustin), pp. 93–136. Oxford University Press, Cape Town.
- Mellor, P.S. (1992) *Culicoides* as potential orbivirus vectors in Europe. *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses* (ed. by E. Walton & B.I. Osburn), pp. 278–283. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Mellor, P.S. (2004) Infection of the vectors and bluetongue epidemiology in Europe. *Veterinaria Italiana*, **40**, 167–174.
- Mellor, P.S. & Pitzolis, G. (1979) Observations on breeding sites and light trap collections of *Culicoides* during an outbreak of bluetongue in Cyprus. *Bulletin of Entomological Research*, **69**, 229–234.
- Mellor, P.S. & Wittmann, E.J. (2002) Bluetongue virus in the Mediterranean basin, 1998–2001. *The Veterinary Journal*, **164**, 20–37.
- Mellor, P.S., Jennings, D.M., Wilkinson, P.J. & Boorman, J.P.T. (1985) *Culicoides imicola*: a bluetongue virus vector in Spain and Portugal. *The Veterinary Record*, **116**, 589–590.
- Mellor, P.S., Boorman, J. & Baylis, M. (2000) *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology*, **45**, 307–340.
- Mellor, P.S., Carpenter, S., Harrup, L., Baylis, M. & Mertens, P.P. (2008) Bluetongue in Europe and the Mediterranean basin: history of occurrence prior to 2006. *Preventive Veterinary Medicine*, **87**, 4–20.
- Mellor, P.S., Carpenter, S. & White, D.V. (2009) Bluetongue virus in the insect host. *Bluetongue* (ed. by P. Mellor, M. Baylis & P. Mertens), pp. 295–320. Elsevier, London.

- Miranda, M.A., Borr, S.D., Rincón, C. & Alemany, A. (2003) Presence in the Balearic Islands (Spain) of the midges *Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus* group. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**, 52–54.
- Mullens, B.A., Gerry, A.C., Lysyk, T.J. & Schmidtman, E.T. (2004) Environmental effects on vector competence and virogenesis of bluetongue virus in *Culicoides*: interpreting laboratory data in a field context. *Veterinaria Italiana*, **40**, 160–166.
- Muller, M.J., Standfast, H.A., St George, T.D. & Cybinski, D.H. (1982) *Culicoides brevitarsis* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of arboviruses in Australia. *Proceedings of the Third Symposium of Arbovirus Research in Australia* (ed. by T.D. St George & B.H. Kay), pp. 43–49. Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Qld.
- Nevill, E.M., Erasmus, B.J. & Venter, G.J. (1992a) A six-year survey of viruses associated with *Culicoides* biting midges throughout South Africa (Diptera: Ceratopogonidae). *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses* (ed. by T.E. Walton & B.I. Osburn), pp. 314–319. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Nevill, E.M., Venter, G.J. & Edwardes, M. (1992b) Potential *Culicoides* vectors of livestock orbiviruses in South Africa. *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses* (ed. by T.E. Walton & B.I. Osburn), pp. 306–314. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Office International des Epizooties (2006) Bluetongue detected for the first time in Northern Europe. <http://www.oie.int/for-the-media/press-releases/detail/article/bluetongue-detected-for-the-first-time-in-northern-europe/> [Accessed 23 October 2011].
- Office International des Epizooties (2009) http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/BLUE_TONGUE_FINAL.pdf [Accessed 23 October 2011].
- Paweska, J.T., Venter, G.J. & Mellor, P.S. (2002) Vector competence of South African *Culicoides* species for bluetongue virus serotype 1 (BTV-1) with special reference to the effect of temperature on the rate of virus replication in *C. imicola* and *C. bolitinos*. *Medical and Veterinary Entomology*, **16**, 10–21.
- Purse, B.V., Mellor, P.S., Rogers, D.J., Samuel, A.R., Mertens, P.P.C. & Baylis, M. (2005) Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 171–181.
- Riegler, L. (2002) Variation in African horse sickness virus and its effect on the vector competence of *Culicoides* biting midges. PhD Thesis. University of Surrey, Guildford.
- Sabirovic, M., Roberts, H., Papadopoulou, C., Lopez, M., Hancock, R. & Calistri, P. (2009) International disease monitoring, July to September 2009. *The Veterinary Record*, **165**, 552–555.
- Sarto i Monteys, V., Ventura, D., Pages, N., Aranda, C. & Escosa, R. (2005) Expansion of *Culicoides imicola*, the main bluetongue virus vector in Europe, into Catalonia, Spain. *The Veterinary Record*, **156**, 415–417.
- Savini, G., Goffredo, M., Monaco, F. *et al.* (2005) Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *The Veterinary Record*, **157**, 133–139.
- Sellers, R.F., Pedgley, D.E. & Tucker, M.R. (1978) Possible wind-borne spread of bluetongue to Portugal, June–July 1956. *Journal of Hygiene*, **81**, 189–196.
- Venter, G.J. & Paweska, J.T. (2007) Virus recovery rates for wild-type and live-attenuated vaccine strains of African horse sickness virus serotype 7 in orally infected South African *Culicoides* species. *Medical and Veterinary Entomology*, **21**, 377–383.
- Venter, G.J., Paweska, J.T., Van Dijk, A.A., Mellor, P.S. & Tabachnick, W.J. (1998) Vector competence of *Culicoides bolitinos* and *C. imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) for South African bluetongue virus serotypes 1, 3 and 4. *Medical and Veterinary Entomology*, **12**, 378–385.
- Venter, G.J., Paweska, J.T., Lunt, H., Mellor, P.S. & Carpenter, S. (2005) An alternative method of blood-feeding *Culicoides imicola* and other haematophagous *Culicoides* species for vector competence studies. *Veterinary Parasitology*, **131**, 331–335.
- Venter, G.J., Koekemoer, J.J.O. & Paweska, J.T. (2006) Investigations on outbreaks of African horse sickness in the surveillance zone of South Africa. *Revue Scientifique et Technique, Office International des Epizooties*, **25**, 1097–1019.
- Venter, G.J., Wright, I.M., Del Rio, R., Lucientes, J. & Miranda, M.A. (2010) The susceptibility of *Culicoides imicola* and other South African livestock-associated *Culicoides* species to infection with bluetongue virus serotype 8. *Medical and Veterinary Entomology*, **25**, 320–326.
- Walter, S.D., Hildreth, S.W. & Beaty, B.J. (1980) Estimation of infection rates in populations of organisms using pools of variable size. *American Journal of Epidemiology*, **112**, 124–128.
- Walton, T.E. (2004) The history of bluetongue and a current global overview. *Veterinaria Italiana*, **40**, 31–38.
- Ward, M.P. (1994) The epidemiology of bluetongue virus in Australia – a review. *Australian Veterinary Journal*, **71**, 3–7.

Accepted 15 July 2011

9.2 Manuscrito II

Collection of *Culicoides* spp. with different light trap models under several climatic conditions

del Río R., Monerris M., Miquel M., Borràs D., Calvete C., Estrada R., Lucientes J. y Miranda MA.

Collection of *Culicoides* spp. with different light trap models under several climatic conditions

R. Del Río¹, M. Monerris¹, M. Miquel¹, D. Borràs², C. Calvete³, R. Estrada⁴, J. Lucientes⁴ & M. A. Miranda¹.

1: University of the Balearic Islands

2: Instituto de Biología Animal. Conselleria d'Agricultura, Ramaderia i Medi Ambient. Illes Balears.

3: CITA. Aragón.

4: Dept. Parasitología. Universidad de Zaragoza

ABSTRACT

Bluetongue (BT) is a viral disease that affects ruminants, being especially pathogenic in certain breeds of sheep. Its viral agent (Bluetongue Virus; BTV) is transmitted by several species of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). Different types of suction light traps are being used in a number of countries for the collection of BTV vector species. In order to compare the relative effectiveness of different light traps in field conditions four of them were assayed in this study: i) Onderstepoort ii) Mini-CDC iii) Rieb and iv) Pirbright. Traps were placed in four different locations in a cattle farm located in Mallorca (Balearic Islands, Spain) and rotated following a randomized block design during several non consecutive nights. Results showed remarkable disparities in their effectiveness for the collection of *Culicoides*. Onderstepoort trap collected more *Culicoides* midges along the autumn period than the other traps. Conversely, during the spring season, mini-CDC showed a better performance in the collection of *Culicoides* than the other traps. However, LSD test showed no significant differences between the traps ($P < 0.05$). In terms of specificity all four trap types captured the same species and showed non remarkable differences between them. Results also indicated that Onderstepoort trap was more sensitive than the others traps in low vector population conditions.

INTRODUCTION

Several species of *Culicoides* are involved in the transmission of a variety of pathogens (Meiswinkel, Venter, Nevill, 2004). The most important, from an economical point of view, are the viruses that cause Bluetongue and African Horse Sickness (Mellor *et al.*, 1985). Of the approximately 1400 species of *Culicoides* world-wide, less than 20 are considered actual or possible vectors for BTV (OIE, 1998; Mellor, 1990). The main species considered to be responsible for the transmission of the virus in Europe are *C. imicola*, *C. obsoletus*, *C. dewulfi* and *C. pulicaris* (Blackburn *et al.*, 1985). However, due to the global raise of temperatures some *Culicoides* species that nowadays are not considered as vectors could start to play a role in the transmission of disease (Purse, Mellor, Rogers *et al.*, 2005).

BT affected the Balearic Islands during 2000 and 2003 (OIE, 2000; OIE, 2003). Since then, several outbreaks are being reported in different regions of the Iberian Peninsula (Calvete *et al.*, 2006) being a constant threat for the livestock industry. In Europe, the earliest outbreaks of the disease started in the Mediterranean basin (Polydorou, 1998) and, since then, BT has expanded its influence area to the north as far as Belgium and Holland (Gloster *et al.*, 2007).

An entomological surveillance program has been developed in all European countries where an outbreak of the disease was detected during the last years. In those countries, the activity period and distribution of the vector population is being monitored.

The main tools used for the surveillance of BTV vector population are light traps. Most of the traps used for the collections of *Culicoides* are provided with a light source to attract the insects and a draught back suction fan that collects the captures into a plastic container. Even if most of light traps have similar characteristics they differ in their performance and not all the countries involved in the European *Culicoides* surveillance program are using the same kind of traps. This fact hinders data comparison among different countries.

In order to facilitate comparison of *Culicoides* collections from different countries, four different traps (Onderstepoort, Mini-CDC, Rieb and Pirbright) were evaluated in this study and its relative effectiveness was analysed.

MATERIAL AND METHODS

- Location

The present study was conducted in a dairy farm located in Llubí (Son Bernat, 39° 42'N 3° 01'E, Balearic Islands, Spain) where the presence of different *Culicoides* species was previously detected. The farm held at the time of the study around fifty dairy cattle stabled in a 25 m² enclosure.

- Traps

Four different traps were assayed:

1. *Onderstepoort trap*:

Developed by the Onderstepoort Veterinary Institute in South Africa and manufactured since then by the Institute of agricultural engineering of that country (ARC-OVI). It is a 220 V down-draught trap equipped with a 30 cm 8W ultraviolet (UV) (black light) tube. It is a heavy (4kg) and compact trap built in metal. The capture of the insects is achieved by a suction fan with mean air flow displacement capacity of 204.5 m³/min. (S.D. = 9.47) (Venter, Meiswinkel, 1994; Goffredo, Meiswinkel, 2004). Captures are collected in a 500 ml beaker, but containers of different sizes and shapes can be adapted upon necessity. Two mm polyester mesh placed around the trap avoids the collections of insects of bigger size. This trap has been used in South Africa since 1970 (Meiswinkel, Venter, Nevill, 2004), and from 1996 is being used in several countries in Europe such as Italy (Goffredo, Meiswinkel, 2004), Greece (Patakakis, 2004), Switzerland (Cagienard, Griot, Mellor *et al.*, 2006) and France (Baldet T *et al.*, 2008; Balenghien, 2008).

2. *Mini-CDC trap*:

Manufactured by John Hock Company (Gainesville, FL, USA) (Driggers, O'Connor, Kardatzke *et al.*, 1980). The source of attraction in this trap is a 15 cm 4 W UV black light tube and can be activated via AC power with an adaptor or via 6/12V rechargeable battery. It can also be equipped with a photo-sensitive switch with multiple function choices. This trap is built in plastic and weights 0.8 Kg. Capture of insects is achieved by a suction fan with a mean air flow displacement capacity of 11.06 m³/min (Chandler,

Highton, 1975). Insects are collected in a 450 ml beaker, but different container shapes and sizes could be adapted. Collection of moths and big size insects are avoided by a 5 mm metallic mesh placed between the light source and the suction fan. This kind of trap is used in Spain (Miranda, Borràs, Rincón, 2004), Portugal (Capela, Sousa, Pena *et al.*, 1993), Belgium (De Deken, Madder, Deblauwe *et al.*, 2008) and the United States (Smith, Mullens, 2003).

3. Rieb trap:

Designed by J.P. Rieb in 1979 (Rieb, 1982). This trap is equipped with a 15 cm 4 W UV white light tube and can be connected to AC power via 12V adaptor. It is manufactured in plastic and weights approximately 1 Kg. Moths and other big insects are excluded by a five mm plastic mesh placed around the light source. Insects are collected in a plastic beaker of 40 ml. This trap was used for monitoring purposes in France between 2000 and 2005 (Baldet, Delécolle, Mathieu *et al.*, 2004), and in 2006 was replaced by the Onderstepoort trap.

4. Pirbright trap

Designed in the Institute of Animal Health (IAH, Pirbright, UK) by John Boorman. The source of light of this trap is a 16V 24W incandescent bulb and is powered from AC. This trap weighs 2.4 Kg. Moths and any other big insects are excluded by a 5 mm metal mesh placed around the light source. Insects are collected in a 90 ml plastic beaker. This trap was used for *Culicoides* surveys in the UK and Spain during the African Horse Sickness outbreak in the 90s (Rawlings, Mellor, 1994). It was also used in Greece (Patakakis, 2004) and in the north and east of Africa (Baylis, Hasnaoui, Bouayoune *et al.*, 1997; Rawlings, Snow, Boorman *et al.*, 1998) but is no longer commercially available and was replaced by the Onderstepoort trap in 1996.

- Experimental design

Traps were deployed during several nights following a randomized block design (Snedecor, Cochran, 1980) and avoiding interferences due to site or occasion (Perry, Wall, Greenway, 1980).

Collections were conducted in three separated assays. In the first one, the four traps were compared on nine non consecutive nights in mid autumn (18 October to 19 November 2007). The second one took place the following spring (18 February to 5 June 2008) with a total of 21 nights sampled. The last one was conducted again in autumn to contrast earlier results (1 October to 17 November 2008) and a total of 16 nights were sampled.

Trapping was conducted from dusk till dawn on selected nights. Each trap was located 1.5 meters high in different sites of the farm taking into account the following considerations: i) Traps were separated enough to avoid light interference between them. However, ii) traps were close enough so weather changes affected them equally.

When none or very few *Culicoides* midges were collected during one specific night due to adverse weather conditions or trap failure, sampling was repeated on a following night.

- Collection procedure

Insects were collected in a plastic beaker filled with water where a few drops of detergent were added to break surface tension and facilitate sinking of the captures.

Specimens were collected early in the morning and preserved in 70% ethanol. *Culicoides* were sorted by sex and gonotrophic condition (Dyce, 1969) in the insectary. Identification of the different *Culicoides* species was conducted according to their wing pattern (Rawlings, 1996).

- Statistical analysis

Data was analyzed using the statistical program StatGraphics Plus and SPSS. Analysis of variance (ANOVA) was used to differentiate among trap treatment effects. The data was not normally distributed and had heterogeneous treatment variances, thus the data was log transformed and the testing done at the 5% level. Treatment means were separated using Fisher's protected t-test least significant difference (LSD) at the 5% level of significance (Snedecor and Cochran, 1980).

Results

- First Assay (autumn period) (18 October – 19 November 2007)

During this period a total of 679 *Culicoides* midges belonging to five species (*C. newsteadi* (Austen 1921), *C. imicola* (Kieffer 1913), *C. circumscriptus* (Kieffer 1918), *C. obsoletus* (Meigen 1918), *C. univittatus* (Vimmer 1932)) were collected. The failure of the Mini-CDC trap during the first sampling night and the late inclusion of the Pirbright trap in the assay due to logistic problems prevented that the same number of nights were sampled for all traps. Thus, results for this assay were compared using the means and not the total amount of collected *Culicoides*. Onderstepoort trap collected the highest number of *Culicoides* (65.8% of the total mean catch), while Rieb trap collected the lowest (4.5% of the total mean catch) (Table 1). Significant differences were found in the capture of midges among Rieb and the other three traps (dif. > 0.7; $P < 0.05$) but not between the Onderstepoort and the Pirbright and the mini-CDC traps

Table 1. Summary of the *Culicoides* captures with each trap showing the number of assays and the mean catch (\bar{X}) with its standard error (S.E.). Number (n) and percentage of captures separated by species in each trap and percentage of the total capture for each species by trap is also shown.

	Onderstepoort		Mini-CDC		Pirbright		Rieb		Total
Nº Assays	10		9		6		10		
$\bar{X} \pm \text{S.E.}$	43 ± 15,6		14,9 ± 2,8		13,6 ± 3,1		3,3 ± 1,4		
Captures (n)	430		134		82		33		679
Species	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)
<i>C. newsteadi</i>	60,2	66,5	49,6	17,3	64,9	9,7	86,2	6,5	59,6
<i>C. imicola</i>	22,5	69,8	29,3	28,7	3,5	1,5	0	0	21,2
<i>C. univittatus</i>	7,3	49,2	16,5	34,9	14,0	12,7	6,9	3,2	9,8
<i>C. obsoletus</i>	8,5	69,2	4,5	11,5	14,0	15,4	6,9	3,8	8,1
<i>C. circumscriptus</i>	1,4	75,0	0	0	3,5	25,0	0	0	1,2
Total	100	63,3	100	19,7	100	12,1	100	4,9	100

* Total catch of *Culicoides* species by trap

Only three of the five species collected were found in all four traps, namely: *Culicoides newsteadi*, *Obsoletus* group and *Culicoides univittatus*. *C. imicola* was captured by Onderstepoort, Mini-CDC and Pirbright traps but not by Rieb trap and *Culicoides circumscriptus* was captured only by the Onderstepoort and the Pirbright traps (Table 1).

C. newsteadi was the most abundant species in all four traps, ranging from 49.6% of the captures in the Mini-CDC trap to 86.2% in the Rieb trap (Table 1). No statistically significant differences at the 95.0% confidence level were observed between the mean values of the captures of this species between the Onderstepoort, Mini-CDC and the Pirbright traps. However, significant differences were found between Rieb-Onderstepoort and Rieb-MiniCDC traps (dif.= 0.3; $P < 0.05$). The second most abundant species was *C. imicola* as indicated by the Onderstepoort (22.5% of the total trap catch) and the Mini-CDC traps (29.3% of the total trap catch) (Table 1). Significant differences between the mean values of *C. imicola* and other *Culicoides* species captures were found when comparing these two traps with the Rieb and the Pirbright traps (dif. > 1; $P < 0.05$). The study conducted during that period showed only preliminary results. However, it was used as a baseline for the next trap comparison assays.

- Second Assay: (winter/spring period) (18 February-5 June 2008)

During this assay a total of 21 nights were sampled and 5128 *Culicoides* midges were collected. Rieb trap was retired from the study in the fifth night of the trial due to its repeated mechanical failures. This assay was divided into two periods according to the abundance of *Culicoides* population in the field. The first period (18 February – 14 March 2008) was useful to determine the sensitivity of each trap in conditions of low *Culicoides* abundance, while during the second period (16 April- 5 June 2008) the different traps were compared in conditions of high *Culicoides* abundance.

i) First period: (18 February – 14 March 2008)

This part of the assay was conducted during low *Culicoides* abundance period. Captures during this period were normally under 20 *Culicoides*/trap night except for two nights where collections were higher. Sampling was conducted during eight nights and a total of 375 *Culicoides* midges belonging to eight different species were collected.

Although the average number of midges collected with the Onderstepoort trap (31.2 C/n) was higher than the other two traps (Mini-CDC: 7.9 C/n, Pirbright: 7.8 C/n (Table 2)) no statistically significant differences were observed (dif.< 0.5; $P < 0.05$).

The most captured species with all three traps during that period belonged to the *Obsoletus* complex (58.9% of the total catch) followed by *Culicoides univittatus* (16.9% of the total catch), *Culicoides newsteadi* (14.4% of the total catch) and *Culicoides circumscriptus* (6.9% of the total catch) (Table 2). *C. imicola* was collected with Pirbright and Onderstepoort traps (1.0% of the total catch) but no with the Mini-CDC trap. Other three species, namely *C. impunctatus* (Goetghebuer 1920), *C. punctatus* (Meigen 1804) and *C. jumineri* (Callot & Kremer 1969) were collected only with the Onderstepoort trap and represented < 1% of the total *Culicoides* captures (Table 2). No statistically significant differences were observed in the capture of *C. obsoletus* in relation to other *Culicoides* species between the different traps (dif.< 0.2; $P < 0.05$). Neither was a significant difference found in the sex ratio and gonotrophic state of *C. obsoletus* among the different traps.

Table 2. Summary of *Culicoides* captures with each trap showing the number of assays and the mean catch (\bar{X}) with its standard error (S.E.). Number (n) and percentage of captures separated by species in each trap and the percentage of the total capture of each species by trap is also shown.

	Onderstepoort		Mini-CDC		Pirbright		Total
Nº Assays	8		8		8		
$\bar{X} \pm \text{S.E.}$	31,2 ± 16,7		7,9 ± 2,9		7,8 ± 4,9		
Captures (n)	250		63		62		375
Species	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)
Obs. group	61,1	67,0	69,8	19,1	42,7	13,9	59,0
<i>C. univittatus</i>	18,6	71,2	7,9	7,6	18,7	21,2	16,9
<i>C. newsteadi</i>	12,7	57,1	17,5	19,7	17,3	23,2	14,4
<i>C. circumscriptus</i>	4,4	40,7	4,8	11,1	17,3	48,1	6,9
<i>C. imicola</i>	0,4	25	0	0	4	75	1,0
<i>C. impunctatus</i>	0,8	100	0	0	0	0	0,5
<i>C. punctatus</i>	0,8	100	0	0	0	0	0,5
<i>C. jumineri</i>	1,2	100	0	0	0	0	0,8
Total	100	66,6	100	16,8	100	16,5	100

* Total catch of *Culicoides* species by trap

ii) Second period: (16 April- 5 June 2008)

Sampling in this period was conducted during 12 non consecutive nights and a total of 4564 *Culicoides* midges belonging to seven species were collected.

Unlike the former results, Mini-CDC trap captured more *Culicoides* midges ($\bar{\chi} = 193.4$ C/n; 49.15 % of the total catch) than the other traps (Onderstepoort: $\bar{\chi} = 98.9$ C/n; 30.3% of the total catch, Pirbright: $\bar{\chi} = 78.9$ C/n; 17.5% of the total catch) (Table 3). However, no statistically significant differences were found between the mean values of the captures from the different traps at a 95% confidence level.

Out of the seven *Culicoides* species collected, only five were present in all three traps. These were: Obsoletus group (72.6% of the total catch), *C. newsteadi* (17.3% of the total catch), *C. univittatus*, *C. jumineri* and *C. circumscriptus*. *C. imicola* was collected only with the Onderstepoort and the Mini-CDC trap and represented < 1% of the total catch. *C. impunctatus* was collected only with the Mini-CDC trap (Table 3). The Obsoletus group was the most abundant in all traps ranging from 60.5% in the Pirbright trap to 76.2% in the Mini-CDC trap. No statistically significant differences were observed in the capture of the Obsoletus group in relation to other *Culicoides* species (dif.< 0.08; $P < 0.05$) or in its sex ratio and gonotrophic state among the different traps.

Table 3. Summary of the *Culicoides* captures with each trap showing the number of assays and the mean catch (\bar{X}) with its standard error (S.E.). Number (n) and percentage of captures separated by species in each trap and the percentage of the total capture of each species by trap is also shown.

	Onderstepoort		Mini-CDC		Pirbright		
N° Assays	12		12		12		
$\bar{x} \pm S.E.$	98,9 \pm 30,1		193,4 \pm 67,5		78,9 \pm 23,2		Total
Captures (n)	1423		2321		820		4564
Species	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)
Obs. group	74,9	31,9	76,9	51,9	60,5	16,2	72,6
<i>C. univittatus</i>	2,4	18,0	2,2	26,3	11,3	55,7	4,1
<i>C. newsteadi</i>	18,1	32,4	16,7	48,0	16,6	19,5	17,3
<i>C. circumscriptus</i>	2,5	20,9	2,7	35,6	8,0	43,5	3,8
<i>C. imicola</i>	0,1	14,3	0,2	85,7	0	0	0,1
<i>C. impunctatus</i>	0	0	0,1	100	0	0	0,1
<i>C. jumineri</i>	1,9	31,1	1,1	30,0	3,6	38,9	1,9
Total	100	30,3	100	49,5	100	17,5	100

* Total catch of *Culicoides* species by trap

A significant difference between the numbers of *Culicoides* midges captured during the two sampling periods was observed, with an increase factor of 6.2 for the Onderstepoort trap, 12.6 for the mini-CDC trap and 10.2 for the Pirbright trap in the second period compared to the first period.

- Third Assay: (1 October- 17 November 2008)

During this period 16 nights were sampled and 1192 *Culicoides* midges belonging to seven different species were collected.

96% of the catch was obtained during the first nine sampling nights. In this period, Onderstepoort trap collected again a higher number of *Culicoides* (69.9% of the total catch) compared to the Mini-CDC (19.9% of the total catch) and the Pirbright (9.2% of the total catch) traps (Table 4). According to Fisher's least significant difference (LSD) procedure a statistically significant difference between the mean capture values with the Pirbright trap related to the other two traps was observed. However, no significant differences between the captures obtained with the Onderstepoort compared to the Mini-CDC trap were observed.

The seven species of *Culicoides* (*C. imicola*, Obsoletus group, *C. newsteadi*, *C. maritimus* (Kieffer 1924), *C. jumineri*, *C. paolae* (Boorman 1996) and *C. circumscriptus*) were collected in all three traps. *C. newsteadi* was the most abundant ranging from 79.0% in the Mini-CDC trap to 86.7% in the Pirbright trap (Table 4). No significant differences were observed in the captures of *C. newsteadi* related to other species among the different traps.

The second most collected species was *C. imicola* in the Onderstepoort trap (5.0% of the total catch) and *C. circumscriptus* in the Mini-CDC and Pirbright traps (4.8 and 3.5% of the total catch respectively). No significant differences were observed in the captures of *C. imicola* related to other species among different traps.

Table 4. Summary of the *Culicoides* captures with each trap showing the number of assays and the mean catch (\bar{X}) with its standard error (S.E.). Number (n) and percentage of captures separated by species in each trap and the percentage of the total capture of each species by trap is shown.

	Onderstepoort		Mini-CDC		Pirbright		Total
Nº Assays	9		9		9		
$\bar{X} \pm \text{S.E.}$	89,8 \pm 35,9		29,6 \pm 5,2		12,9 \pm 5,7		
Captures (n)	835		248		113		1196
Species	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)	(%)*	(%)
Obs. group	4,19	74,47	4,44	23,40	0,88	2,13	3,93
<i>C. newsteadi</i>	85,62	70,86	79,03	19,43	86,74	9,71	84,36
<i>C. circumscriptus</i>	1,44	42,86	4,84	42,86	3,54	14,29	2,34
<i>C. imicola</i>	5,03	82,35	2,82	13,73	1,77	3,92	4,26
<i>C. paolae</i>	0,48	57,14	0,81	28,57	0,88	14,29	0,59
<i>C. maritimus</i>	2,28	59,38	4,03	31,25	2,65	9,38	2,68
<i>C. jumineri</i>	0,96	36,36	4,03	45,45	3,54	18,18	1,84
Total	100	69,82	100	20,74	100	9,45	100

* Total catch of *Culicoides* species by trap

- Gonotrophic status of main vector species

The gonotrophic status of the main vector species in Spain (i.e. *Obsoletus* group and *C. imicola*) was analysed.

All three traps collected mainly nulliparous and parous *Culicoides* females. In spring, when most *Culicoides* species increase, the ratio Nulliparous/Parous observed in the captures for the *Obsoletus* group was 3.7 with the Mini-CDC and Onderstepoort trap, and 3.0 with the Pirbright trap. The ratio Nulliparous/Gravid females was 15.6 with the Mini-CDC trap, 9.4 with the Onderstepoort trap and 18.0 with the Pirbright trap. The ratio Nulliparous females/Males was 24.6 with the Mini-CDC trap, 13.1 with the Onderstepoort trap and 6.4 with the Pirbright trap (Table 5). Gravid females and males constituted <10% of the catch in Onderstepoort and Mini-CDC traps. However, captures of males was 10.14% of the total catch in the Pirbright trap.

Table 5. Results of the total number and the gonotrophic state of the *Obsoletus* complex captured with the different light traps during three periods of the year (spring, autumn and winter) 2008.

	Total	% Nulliparous	% Parous (N/P)*	% Gravids (N/G)**	% Males (N/M)***
<i>Febr.-March 08</i>					
Mini-CDC	44	61,4	15,9 (3.8)	22,7 (2.7)	0
Onderstepoort	155	43,9	36,8 (1.2)	18,0 (2.4)	1,3 (33.7)
Pirbright	33	48,5	21,2 (2.3)	27,3 (1.8)	3,0 (16.0)
<i>April-Jun. 08</i>					
Mini-CDC	1756	72,9	19,5 (3.7)	4,7 (15.6)	3,0 (24.6)
Onderstepoort	1011	68,8	18,6 (3.7)	7,3 (9.4)	5,2 (13.1)
Pirbright	503	64,6	21,7 (3.0)	3,6 (18.0)	10,1 (6.4)
<i>Oct.-Nov.08</i>					
Mini-CDC	11	72,7	27,3 (2.7)	0	0
Onderstepoort	35	71,4	25,7 (2.8)	2,9 (25.1)	0
Pirbright	1	100	0	0	0
TOTAL	3549	63,3	20,3 (3.1)	6,3 (10.1)	4,5 (14.1)

* Ratio Nulliparous/Parous ** Ratio Nulliparous/Gravid *** Ratio Nulliparous/Male

Statistically significant differences between captures of nulliparous females and females on other gonotrophic status and males were found for all three traps during the spring period (April – June 2008). In addition, statistically significant differences between captures of parous females-males were found for the Mini-CDC trap and between captures of parous-gravid females for the Pirbright trap.

Captures of *C. imicola* during the spring period were not high enough to run an adequate statistical analysis. Similarly, captures during autumn and winter were too low for both the *Obsoletus* group and *C. imicola* to set up a statistical analysis.

- Captures depending on site

Statistically significant differences in the captures obtained in one of the three selected sampling sites was observed ($\alpha=0,317$ U Mann-Whitney test).

Discussion

This work presents the first results at an European level about the dynamic of populations of different *Culicoides* species according to their capture with different light traps.

- *C. imicola*

Both Onderstepoort and Mini-CDC traps captured a high percentage of *C. imicola* during the first but not during the second assay. These results are in line with previous data that situated the peak of abundance of this species during September-October in our region (Miranda, Borràs, Rincón, 2004) and confirm the usefulness of these traps for the capture of this vector species. *C. imicola* is considered the main vector for BT in Spain as it has been related to the transmission of BTV-1, -2, -4 and 16 (Boorman, 1991; Venter, Paweska, van Dijk *et al.*, 1998; Allepuz, Garcia-Bocanegra, Napp *et al.*, 2010). Furthermore, it has been shown that *C. imicola* is expanding its distribution area towards the north of Spain (Purse, Mellor, Rogers *et al.*, 2005; Calvete, Estrada, Miranda *et al.*, 2010). During the third assay, the population level of *C. imicola* was abnormally low compared to its abundance in former years (Miranda, Borràs, Rincón, 2004), thus reflecting a variable population dynamic pattern. When population levels of *C. imicola* were high, Onderstepoort trap was the most efficient trap for the capture of the vector (Table 1). However, when populations are low, all three traps seem to be equally sensitive for the capture of this species (Tables 2, 3 and 4). Studies conducted in South Africa by Venter *et al* showed that the Onderstepoort trap captured three times more *Culicoides* midges than Mini-CDC, Pirbright and Rieb traps in conditions of high as well as of low *Culicoides* abundance (Venter, Labuschagne, Hermanides *et al.*, 2009). *C. imicola* composed >90% of the total catch in the South African trial, while in the present study the presence of this vector species in the trap collections was <20%. In both studies, the Onderstepoort trap collected higher number of *Culicoides* than the other traps during the peak population level of *C. imicola*. Thus, Onderstepoort trap seems to be the most suitable trap for the capture of this vector species in the south of Europe and Africa.

- Obsoletus group

During the spring-summer period, when the dominant species were those belonging to the *Obsoletus* complex, the most efficient trap for the capture of midges was Mini-CDC. These species were not present among the captures obtained by Venter et al in their trap comparison study (Venter, Labuschagne, Hermanides *et al.*, 2009) and could be the reason of the differences between the two assays. The most abundant *Culicoides* species captured with UV light traps in Europe belongs to the *Obsoletus* group and can constitute up to 80% of the total catch in France, up to 50% in the UK and up to 90% in northern Italy (Goffredo, Calistri, Capelli *et al.*, 2008). *C. obsoletus* is also the most captured *Culicoides* species in the Netherlands (Meiswinkel, Goffredo, Leijs *et al.*, 2008), Belgium (Losson, De Dekken, Fassote *et al.*, 2007) and Germany (Melhorn, Walldorf, Klimpel *et al.*, 2008). Two species of this group (*C. obsoletus* and *C. scoticus* (Downes & Kettle 1952)) have shown their vector potential (Savini, Goffredo, Monaco *et al.*, 2005). For this reason, captures of *Culicoides* from the *Obsoletus* group are important for the epidemiological studies. Results in the present work are in agreement with data from previous publications that showed low population levels of midges from the *Obsoletus* group during autumn and winter and high levels during spring (Table 1) (Miranda, Borràs, Rincón *et al.*, 2003).

- Capture specificity

Differences in the structure and in light emission among the traps used in this study could be the reason why some *Culicoides* species were lured to one type of trap or another. This could explain why the Onderstepoort trap collected a higher proportion of *Culicoides* in two assays (when the dominant species were *C. newsteadi* and *C. imicola*), while in the other assay (when the dominant species belonged to the *Obsoletus* group) the Mini-CDC trap captured significant more midges than the other traps.

The most effective trap in terms of *Culicoides* capture along different seasons of the year may depend on the species composition within the *Culicoides* populations during the chosen sampling period and on the behaviour of the different species towards each trap. Bishop *et al* showed that different *Culicoides* species were distinctly attracted to light

emitting diodes (LEDs) depending on their emission spectrum (Bishop, Bellis, McKenzie *et al.*, 2006). Lloyd *et al.* showed also that different *Culicoides* species (*C. furens* and *C. mississippiensis*) were attracted and captured discriminately by different CO₂ traps with similar characteristics (MM-Freedom and MM-Liberty Plus). In this case, small variations in temperature and CO₂ emissions could underlie the different capture properties of each trap regarding the species composition of *Culicoides* populations (Lloyd, Kline, Hogsette *et al.*, 2008). The emission power of the Onderstepoort trap (8W) doubles that of the other traps (4W) and also the fan of Onderstepoort trap has more air displacement capacity than the others. This may be the reason why the Onderstepoort trap captured more insects than the other traps when the population level of *Culicoides* was low. However, in high *Culicoides* level conditions there is apparently no need of strong light emission and aspiration power since the Mini-CDC trap was able to capture 63% more *Culicoides* midges than the Onderstepoort trap. The specificity of the Mini-CDC trap to capture *C. obsoletus* could be the reason why this trap obtained more captures than the other traps during that period. Pirbright trap was the least efficient in capture numbers, sensitivity and species composition compared to the other two traps possibly because its source of light (incandescent bulb) that seems to be less attractant for *Culicoides* than the U.V. light used in the other traps. Thus, the Onderstepoort and the Mini-CDC trap would be more adequate than the Pirbright for monitoring purposes or when high numbers of *Culicoides* are needed (such as vector competence studies).

The percentage of the total *Culicoides* population that light traps are able to capture when placed near the animals is unknown. Comparison of light traps with other sampling methods (e.g. CO₂ traps, bait animals or truck trapping) showed important variations in the number of captures as well as in species composition (Holbrook, Wuerthele, 1984; Anderson, Linhares, 1989) and some species that could be important for the transmission of the disease (e.g. *C. chiopterus*) are underestimated (Carpenter, Szmaragd, Barber *et al.*, 2008). In fact, some comparative studies conducted in South Africa with different sampling methods estimated that captures obtained with light traps were <0.0001% of the total population (Meiswinkel, Venter, Nevill, 2004). However, light traps offer constant results year after year and they are considered so far as the most practical method to assess vector abundance even though the variety of factors that can affect the captures are not completely known.

- Site effect

According to our results, traps collected more midges in one of the three selected capture sites creating an 'effect by site' that is reflected in the standard deviations obtained. However, the different traps stayed the same number of nights in the different capture sites balancing this effect. The existence of breeding sites nearby or passageways for *Culicoides* could be the main reasons why the same trap collects significantly more midges in one site than in other site relatively close to the first one. The selection of the capture site for monitoring purposes is of paramount importance in epidemiological studies since the information obtained from light traps is to be used by the EU to declare a possible epidemiologic risk situation (currently stated as five parous vector females per trap per night). The most appropriate site to place a light trap for *Culicoides* is outside stables, near the night rest zones of animals and in open areas where no obstacles could interfere with the light of the trap.

- Gonotrophic status

This is the first work in which the structure population of the *Obsoletus* group is analysed in the Mediterranean region. All three traps captured around three times more nulliparous than parous females of this group (Table 5). Light traps lure mainly nulliparous and parous *Culicoides* females (i.e. *C. imicola* (Venter, Mellor, Wright *et al.*, 2007). The importance of the *Culicoides* gonotrophic state determination is based on the belief that mainly parous females are capable of transmitting the virus (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW),2008). Therefore, the sensibility of the light traps in the capture of parous vector females should be taken into account in epidemiological studies. Both Onderstepoort and Mini-CDC trap obtained the same ratio nulliparous/parous in the capture of the *Obsoletus* group females during spring, when populations of this complex were high (Table 5). However, during autumn-winter, even if the ratio nulliparous/parous was higher in the Mini-CDC, the total number of parous midges captured with the Onderstepoort was eight times higher. Therefore, Onderstepoort trap should be the trap of choice for monitoring purposes in winter due to its sensibility for the capture of parous

females during low level vector population conditions. There is little information about the response of the midge to the light stimuli regarding its gonotrophic status or its behaviour when changes from one gonotrophic stage to the next. However, it is known that high captures of nulliparous females is an index of population growth. When winter comes, temperatures go down and the biological cycle of the midges slows down in response. In those conditions, higher proportion of parous females are detected and the midge population grows old quickly (Lysyk, Danyk, 2007).

- Overwintering

Results indicated that nulliparous females of the *Obsoletus* group can be captured in the Mediterranean basin during virtually all the cold season due to emergence of new individuals as observed by (Hunt, . Tabachnick, McKinnon, 1989; Gerry, Mullens, 2000; Wittman, Baylis, 2000). Captures of parous females during winter indicate that some of the nuliparous *Culicoides* can survive and blood-feed during part or the whole cold season and are in line with the observations of (Goffredo, Meiswinkel, 2004) in Italy and of (Lysyk, Danyk, 2007) in the USA and Canada. These results are important from the epidemiological point of view due to the subclinic transmission cycle that can be maintained during winter in temperate regions. The different species of the *Obsoletus* group can be captured all year round, not only in Majorca (Miranda, Borràs, Rincón, 2004) , but also in other areas in the north and south of Europe (Rawlings, Mellor, 1994; Miranda, Borràs, Rincón, 2004; Losson, De Dekken, Fassote *et al.*, 2007). In fact, the absence of *Culicoides* during winter, according to captures in light traps, is restricted only to some afro-tropical species such as *C. imicola* in some areas of the south of Europe. In other areas the absence of *Culicoides* is quite short (<15 days) or non existent (Ortega, Lloyd, Holbrook, 1997; Miranda, Borràs, Rincón, 2004; Calvete, Miranda, Estrada *et al.*, 2006). Drop of temperature during the cold season lowers insect population and risk of virus transmission. However, during most of the winter period in our latitude, environmental conditions are not harsh enough to suppress all epidemiological risk since, according to our studies, more than five parous females of vector species can be captured per night with the Onderstepoort trap (data not shown). In those circumstances BTV is able to complete its extrinsic incubation period within the vector when environmental

temperature is $>12^{\circ}\text{C}$ (Wittman, Mellor, Baylis, 2002; Wilson, Carpenter, Gloster *et al.*, 2007) or, in case temperatures are lower, rest in a quiescent state awaiting for better conditions to complete its replication cycle (Mullens, Tabachnick, Holbrook *et al.*, 1995; Paweska, Venter, Mellor, 2002).

Capture of *Culicoides* during the cold season is important in order to determine the “Low Risk Transmission Period” and to understand the overwintering mechanisms of vectors and virus. The low risk transmission period is based in the absence of adult vectors in light traps taking into account also the abundance of the total *Culicoides* population, the climatology of the region and the population dynamics of the vectors during the last two years (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW),2008). In the present study, Mini-CDC and Pirbright traps captured <5 parous vector *Culicoides* females per night during winter showing less sensitivity than the Onderstepoort trap in the detection of the ‘low risk transmission period’ that could affect the free movement of farm animals in the region (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW),2008). For this reason, the Onderstepoort should be the trap of choice during the cold season (*Culicoides* low population conditions).

- Conclusions

Important differences have been detected amongst the different traps assayed for this study:

- During the spring season, when the dominant species were those belonging to the *Obsoletus* group the Mini-CDC trap showed more efficacy in the capture of *Culicoides* midges compared to the Onderstepoort and the Pirbright traps. However, during the autumn season, when the population of *C. imicola* increases, the most efficient trap was the Onderstepoort. Thus, both Mini-CDC and Onderstepoort traps are suitable for the monitoring of the Mediterranean *Culicoides* populations.

- Onderstepoort is the most efficient trap for the capture of *Culicoides* during low population periods compared to Mini-CDC and Pirbright traps. Consequently, the use of the Onderstepoort trap is recommended to establish “BTV Low Risk Transmission” standard periods.

- Both Onderstepoort and Mini-CDC trap detected the increase in the *Culicoides* population level in spring.
- Pirbright trap does not have any advantage (sensitivity, number of captures, number of species etc.) over the other two traps probably due to its source of light (4W incandescent bulb). Therefore Onderstepoort and Mini-CDC are recommended over the Pirbright trap for *Culicoides* studies and monitoring purposes.
- There is a clear “site effect” that should be taken into account when light traps are deployed. The assessment of the different sites where a light trap is going to be set is strongly recommended since the numbers of *Culicoides* captures can vary broadly.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partly initiated by the European Union as part of a project entitled ‘Surveillance Network of Reoviruses, Bluetongue and African Horse Sickness, in the Mediterranean basin and Europe’ (MedReoNet) (contract no. 044285). The authors thank Margalida Frontera (Son Espases Research Unit) for constructive comments of earlier drafts of this manuscript. We also thank the *Conselleria d’Innovació, Interior i Justícia* and the national project ‘*Estudio de la Competencia Vectorial de las Especies de Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) Vectores de la Lengua Azul en España y Evaluación de la Hibernación del Virus en los Vectores*’ for financial support.

REFERENCES

Allepuz, A., García-Bocanegra, I., Napp, S., Casal, J., Arenas, A., Saez, M. y Gonzalez, M.A. (2010) Monitoring Bluetongue disease (BTV-1) epidemic in southern Spain during 2007. *Preventive Veterinary Medicine*, **96**, 263-271.

Anderson, J.R. y Linhares, A.X. (1989) Comparison of several different trapping methods for *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, **5**, 325-334.

Baldet T, Delecolle, J.C., Cetre-Sossah, C., Mathieu, B., Meiswinkel, R., Gerbier, G. y (2008) Indoor activity of *Culicoides* associated with livestock in the Bluetongue virus (BTV) affected region of northern France during autumn 2006. *Preventive Veterinary Medicine*, **87** (1-2), 84-97.

Baldet, T., Delécolle, J.C., Mathieu, B., De La Rocque, S. & Roger, F. (2004) Entomological surveillance of bluetongue in France in 2002. *Veterinaria Italiana*, **40**, 227.

Balenghien, T. (2008) *Culicoides chiopterus*: Confirmation of its status as potential vector of Bluetongue virus in Europe. *ProMed-mail*. International Society for Infectious Diseases, Brookline, MA.

Baylis, M., Hasnaoui, H., Bouayoune, J. y Touti, J. (1997) The spatial and seasonal distribution of African Horse Sickness and its potential *Culicoides* vectors in Morocco. *Medical and Veterinary Entomology*, **11** (3), 203-212.

Bishop, A.L., Worrall, R., Spohr, L.J., McKenzie, H.J., Barchia, I.M. (2004) Response of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) to light-emitting diodes. *Australian Journal of Entomology*, **43**, 184-188

Boorman, J. (1991) A review of *Culicoides* subgenus *Avaritia* species (Insecta: Diptera: Ceratopogonidae) vectors of viruses of sheep, cattle and horses, with particular reference to *Culicoides imicola* in Europe and the Mediterranean region. *A Report Prepared for the Overseas Development Administration. The Natural History Museum, London*.

Cagienard, A., Griot, C., Mellor, P.S., Denison, E. y Stärk, K.D.C. (2006) Bluetongue vector species of *Culicoides* in Switzerland. *Medical and Veterinary Entomology*, **20**, 239-247.

Calvete, C., Estrada, R., Miranda, M.A., del Río, R., Borràs, D., Beldron, F.J., Martínez, A., Calvo, A.J. y Lucientes, J. (2010) Protection of livestock against Bluetongue virus vector *Culicoides imicola* using insecticide-treated netting in open areas. *Medical and Veterinary Entomology*, **24**, 169-175.

Calvete, C., Miranda, M.A., Estrada, R., Borràs, D., Sarto, V., Collantes, F., García de Francisco, J.M., Moreno, N. y Lucientes, J. (2006) Spatial distribution of *Culicoides imicola*, the main vector of Bluetongue virus, in Spain. *Veterinary Record*, **158** (4), 130-131.

Capela, R., Sousa, C., Pena, I. y Caeiro, V. (1993) Preliminary note on the distribution and ecology of *Culicoides imicola* in Portugal. *Medical and Veterinary Entomology*, **7**, 23-26.

Carpenter, S., Szmargd, C., Barber, J., Labuschagne, K., Gubbins, S. y 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**, 1237-1245.

Chandler, J.A. y Highton, R.B. (1975) The succession of mosquito species (Diptera: Culicidae) in rice fields in the Kisumu area of Kenya, and their possible control. *Bulletin of Entomological Research*, **65**, 295-302.

De Deken, G., Madder, M., Deblauwe, I., De Clercq, K., Fassotte, C., Losson, B., Haubruge, E. y De Deken, R. (2008) Vector monitoring at Belgian outbreak sites during the Bluetongue epidemic of 2006. *Preventive Veterinary Medicine*, **87**, 64-73.

Driggers, D., O'Connor, R., Kardatzke, J., Stup, J. & Schiefer, B. (1980) The US army miniature solid state mosquito light trap. *Mosquito News*, **40**, 172-178.

Dyce, A.L. (1969) The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *Australian Journal of Entomology*, **8**, 11-15.

EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). (2008) Scientific opinion of the panel on animal health and welfare. Bluetongue vectors and insecticides. *The EFSA Journal*, **735**, 1-70

Gerry, A.C. y Mullens, A. (2000) Seasonal abundance and survivorship of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) at a southern California dairy, with reference to potential Bluetongue virus transmission and persistence. *Journal of Medical Entomology*, **37**, 675-688.

Goffredo, M. y Meiswinkel, R. (2004) Entomological surveillance of bluetongue in Italy: Methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. *Veterinaria Italiana*, **40** (3), 260-265.

Goffredo, M., Calistri, P., Capelli, G., Dottori, M., Mignone, W., Accorsi, A., Calzolari, M., Giuliano, I., Montarsi, F., Di Nicola, F., Micarelli, G., Ippoliti, C. y Lelli, R. (2008) Distribution and abundance of BTV-8 potential vectors in northern Italy. *Proceedings of the Bluetongue Satellite Symposium "Bluetongue in Europe, Back to the Future!!"*. Brescia, Italy.

Holbrook, F.R. y Wuerthele, W. (1984) A lightweight, hand-portable vehicle-mounted insect trap (*Culicoides variipennis*). *Mosquito News*, **44** (2), 239-242.

Hunt, G.J., Tabachnick, W.J. y McKinnon, C.N. (1989) Environmental factors affecting mortality of adult *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) in the laboratory. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **5** (3), 387-391

Lloyd, A., Kline, D., Hogsette, J., Kaufman, P. y Allan, S. (2008) Evaluation of two commercial traps for the collection of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, **24**, 253-262.

Losson, B., De Dekken, R., Fassote, C., Delécolle, J.C., Baldet, T. y Haubruge, E. (2007) Biting midges overwintering in Belgium. *Veterinary Record*, **160** (13), 451-452.

Lysyk, T.J. y Danyk, T. (2007) Effect of temperature on life history parameters of adult *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in relation to geographic origin and vectorial capacity for Bluetongue virus. *Journal of Medical Entomology*, **44**, 741-751.

Mehlhorn, H., Walldorf, V., Klimpel, S. y Schmahl, G. (2008) Outbreak of bluetongue disease (BTD) in Germany and the danger for Europe. *Parasitology Research*, **103** (1), 79-86.

Meiswinkel, R., Venter, G.J. y Nevill, E.M. (2004) Vectors: *Culicoides* spp. En: *Infectious Diseases of Livestock*, 93–136 (ed. by J.A.W. Coetzer & R.C. Tustin), Oxford University Press, Cape Town.

Meiswinkel, R., Goffredo, M., Leijts, P. y Conte, A. (2008) The *Culicoides* ‘snapshot’: A novel approach used to assess vector densities widely and rapidly during the 2006 outbreak of Bluetongue (BT) in the Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine*, **87**, 98-118.

Miranda, M.A., Borràs, D., Rincón, C. y Alemany, A. (2003) Presence in the Balearic Islands (Spain) of the midges *Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus* group. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**, 52-54.

Miranda, M.A., Borràs, D. y Rincón, C. (2004) Seasonal abundance of *Culicoides imicola* and *C. obsoletus* group in the Balearic Islands (Spain). *Veterinaria Italiana*, **40**, 292-295.

Mullens, B.A., Tabachnick, W.J., Holbrook, F.R. y Thompson, L.H. (1995) Effects of temperature on virogenesis of Bluetongue virus serotype 11 in *Culicoides variipennis sonorensis*. *Medical and Veterinary Entomology*, **9**, 71-76.

OIE. (2003) Bluetongue in Spain: In the Balearic Islands. Emergence report. *Disease Information*, **16**, 240-240.

OIE. (2000) Bluetongue in Spain: In the Balearic Islands. *Disease Information*, **13**, 181-181.

Ortega, M.D., Lloyd, J. & Holbrook, F.R. (1997) Seasonal and geographical distribution of *Culicoides imicola* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) in south western Spain. *Journal of American Mosquito Control Association*, **13**, 227-232.

Patakakis, M.J. (2004) *Culicoides imicola* in Greece. *Veterinaria Italiana*, **40** (3), 232-234.

Paweska, J.T., Venter, G.J. y Mellor, P.S. (2002) Vector competence of South African *Culicoides* species for Bluetongue virus serotype 1 (BTV-1) with special reference to the effect of temperature on the rate of virus replication in *C. imicola* and *C. bolitinos*. *Medical and Veterinary Entomology*, **16**, 10-21.

Perry, J.N., Wall, C. y Greenway, A.R. (1980) Latin square designs in field experiments involving insect sex attractants. *Ecological Entomology*, **5**, 385-396.

Polydorou, K. (1998) The 1977 outbreak of bluetongue in Cyprus. *Tropical Animal Health and Production*, **10**, 229-232.

Purse, B.V., Mellor, P.S., Rogers, D.J., Samuel, A.R., Mertens, P.P. y Baylis, M. (2005) Climate change and the recent emergence of Bluetongue in Europe. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 171-181.

Rawlings, P., Snow, W.F., Boorman, J., Denison, E., Hamblin, C. & Mellor, P.S. (1998) *Culicoides* in relation to transmission of African horse sickness virus in the Gambia. *Medical and Veterinary Entomology*, **12**, 155-159.

Rawlings, P., Snow, W.F., Boorman, J., Denison, E., Hamblin, C. y Mellor, P.S. (1998) *Culicoides* in relation to transmission of African Horse Sickness virus in the Gambia. *Medical and Veterinary Entomology*, **12**, 155-159.

Rawlings, P. & Mellor, P.S. (1994) African horse sickness and the overwintering of culicoides spp in the iberian peninsula. *Revue Scientifique Et Technique De l'Office International Des Epizooties*, **13**, 753-761.

Rieb, J.P. (1982) Contribution à la connaissance de l'écologie et de la biologie des cératopogonidés (Diptera: Nematocera). Tesis. Université Louis Pasteur de Strasbourg.

Savini, G., Goffredo, M., Monaco, F., Di Gennaro, A., Cafiero, M., Baldi, L., De Santis, P., Meiswinkel, R. y Caporale, V. (2005) Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Veterinary Record*, **157**, 133-139.

Smith, H. y Mullens, B.A. (2003) Seasonal activity, size, and parity of *Culicoides occidentalis* (Diptera: Ceratopogonidae) in a coastal southern California salt marsh. *Journal of Medical Entomology*, **40**, 352-355.

Snedecor, G.W. y Cochran, W.G. (1980) Statistical methods. Iowa State University Press *7th Edition*,

Venter, G.J., Labuschagne, K., Hermanides, K.G., Boikanyo, S.N.B., Majatladi, D.M. y 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**, 299-307.

Venter, G.J. y Meiswinkel, R. (1994) The virtual absence of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in a light-trap survey of the colder, high-lying area of the eastern Orange Free State, South Africa, and implications for the transmission of arboviruses. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **61** (4), 327-340.

Venter, G.J., Mellor, P.S., Wright, I. & Paweska, J.T. (2007) Replication of live-attenuated vaccine strains of bluetongue virus in orally infected South African *Culicoides* species. *Medical and Veterinary Entomology*, **21**, 10-239.

Venter, G.J., Paweska, J.T., van Dijk, A.A., Mellor, P.S. y Tabachnick, W.J. (1998) Vector competence of *Culicoides bolitinos* and *C. imicola* for South African Bluetongue virus serotype 1, 3 and 4. *Medical and Veterinary Entomology*, **12**, 378-385.

Wilson, A., Carpenter, S., Gloster, J. y Mellor, P. (2007) Re-emergence of Bluetongue in northern Europe in 2007. *Veterinary Record*, 41:35.

Wittman, E.J. & Baylis, M. (2000) Climate change: Effects on *Culicoides*-transmitted viruses and implications for the U.K. *The Veterinary Journal*, **160**, 107-117.

Wittman, E.J., Mellor, P.S. & Baylis, M. (2002) Effect of temperature on the transmission of arboviruses by the biting midge, *Culicoides sonorensis*. *Medical and Veterinary Entomology*, **16**, 147-156.

9.3 Manuscrito III

Sensitivity of *Culicoides* biting midges to Deltamethrin determined by the WHO standard susceptibility test

del Río R., Venail R., Estrada R., Lucientes J. y Miranda MA.

Sensitivity of *Culicoides* biting midges to Deltamethrin determined by the WHO standard susceptibility test

R. del Río¹, R. Venail², R. Estrada³, J. Lucientes³, M. A. Miranda¹

1: University of the Balearic Islands. Laboratory of Zoology 2: Centre Internationaux de recherche de l'agriculture et du développement (CIRAD) 3: Dept. Parasitología. Universidad de Zaragoza. Department of Parasitology

Abstract

Bluetongue (BT) is an economical important disease responsible for remarkable losses in Europe due to the high level of morbidity and mortality rates caused in ruminants since 2000. Its causative agent, Bluetongue virus (BTV), is transmitted by the bites of the females of several *Culicoides* species (mainly *C. imicola* and *C. obsoletus* in Europe). Besides vaccination, the application of insecticides on animals can protect cattle and sheep from the infections with BTV. However, no commercial formulation has been evaluated specifically against *Culicoides* midges to date. The aim of the present study was to assess the susceptibility of *Culicoides* spp. to deltamethrin using the WHO standard susceptibility test.

Nulliparous females collected in a dairy farm in the Balearic Islands (Spain) were exposed to discriminating dosages of the insecticide for the recommended exposure periods and the mortality at 1h and 24h was recorded. A total of 2904 *Culicoides* midges (78.4% belonging to the *Obsoletus* complex) were assayed and the values of the Lethal Dose 50 (LD₅₀) and Lethal Dose 90 (LD₉₀) were determined. The results indicated that deltamethrin was highly toxic for the assayed *Culicoides* population since a dosage as low as 0.000145% was enough to kill 50% of the population in 24h (LD₅₀). The deltamethrin concentration needed to kill 90% of the population (LD₉₀) was 0.000579%. For the *Obsoletus* complex the doses that killed 50 and 90% of the population were LD₅₀ = 0.000174 and LD₉₀ = 0.000576.

The results obtained could be used to design commercial products with deltamethrin in its formulation aimed specifically against the *Culicoides* biting midges.

Introduction

Since 1998 Europe has become an endemic region for BT causing important losses in farmed ruminants with mortality rates of 3–5% in cattle and up to 40% in sheep (Conraths *et al.* 2007; Mehlhorn *et al.* 2007; Saegerman *et al.* 2008). A number of species can transmit successfully the BTV to susceptible host vertebrates. *C. imicola* is considered as the main vector for BTV in Africa and the south of Europe (Boorman *et al.*, 1985; Mellor *et al.*, 1985) while *C. pulicaris*, *C. dewulfi* and *C. chiopterus* are considered vectors in the north of Europe (Ortega *et al.*, 1998; Balenghien, 2008; Meiswinkel *et al.*, 2008; Stephan *et al.*, 2009). *C. obsoletus* is considered as a main vector species in the south as well as in the north of Europe (Ortega *et al.*, 1998; De Liberato *et al.*, 2005; Mehlhorn *et al.*, 2007). The implication of *C. imicola*, *C. obsoletus* and *C. pulicaris* in the epidemiology of BT disease is based on virus isolations from parous females while the implication of *C. dewulfi* and *C. chiopterus* is only based on PCR analysis (Caracappa *et al.*, 2003; Mehlhorn *et al.*, 2007; Meiswinkel *et al.*, 2007; Melhorn *et al.*, 2008; Mehlhorn *et al.*, 2009; Dijkstra *et al.*, 2008; EFSA, 2008; Vanbinst *et al.*, 2009). *C. obsoletus* is the most frequent species in Europe according to captures with light traps (EFSA, 2008) while *C. pulicaris* and *C. dewulfi* are less abundant and apparently less involved in the transmission of the disease (Meiswinkel *et al.*, 2007).

The insecticide companies had only a few data on the efficacy of their different insecticides against the *Culicoides* midges since their products had been developed to protect ruminants against flies, mosquitoes, simuliids, and/or tabanids (Schmahl *et al.* 2009). The insecticide susceptibility of the different *Culicoides* species is poor documented. To date, only a few publications describe the responses of several *Culicoides* species to certain insecticides (Service, 1969) (Hill & Roberts, 1947) (Kline & Roberts, 1981; Floore, 1985).

The simplest method for detecting resistance using insecticide treatment is the diagnostic dose test. The diagnostic dose is a predetermined insecticide dose that is known to be lethal to a high proportion of susceptible individuals but that a high proportion of resistant individuals can tolerate. A current list of recommended diagnostic doses of many insecticides for a number of arthropod disease vectors is available from the World Health Organization (WHO), as are standardized test kits (WHO 1992). Standardized tests exist

for the immature and adult stages of many vector species. For terrestrial and/or adult stages, insecticide is either applied topically or individuals are exposed to a surface treated with the insecticide.

Insecticide susceptibility tests were developed by the WHO to assess the resistance of the mosquito *Anopheles* (vector of paludism) to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides. The original test procedure can be modified offering the possibility to determine the sensitivity of *Culicoides* to deltamethrin. A useful tool in monitoring the progress of resistance in the strain and in genetic analysis is the dose-response bioassay. In this type of assay, samples of individuals from a strain are subjected to a range of doses of insecticide chosen to produce a range of mortalities among the treated samples. This technique is described in detail by Robertson and Preisler (1992).

The base-line of the WHO test is to expose the biting midges to papers impregnated with different doses of insecticide (0.01%, 0.005%, 0.001%, 0.0005% and 0.0001%) for one hour and record the mortalities at 1h and at 24h after exposure. Therefore, the concentration that kill 50% (or 90%) of individuals, known as LD₅₀ (or LD₉₀), could be determined for each species and population. With this study, base line information of intrinsic sensibilities to insecticides will be available, helping the assessment of commercial formulations of deltamethrin and the development of more efficient formulations against biting midges. In addition, networking could improve the comparison of sensibilities between different populations.

Pyrethroids are an important tool used for the control of vector borne diseases worldwide. These compounds exert its effect in two different ways. First of all, pyrethroids are highly toxic to insects that land on treated animals and they are often killed in a few minutes. Secondly, these insecticides provoke on insects irritation by contact that reduces the biting rate over the host. Deltamethrin is a synthetic insecticide based on the structure of natural pyrethrins that paralyses the nervous system of the insect. There are few results that indicate the efficacy of this compound on adult *Culicoides* (Mehlhorn *et al.*, 2008). However, the efficacy of the insecticide depends on the formulation of the final compound that is to be used to control insect populations.

This work assesses the sensibility of a Mediterranean *Culicoides* population to deltamethrin indicating two lethal doses (LD₅₀ and LD₉₀) for different species collected in the field.

Material and Methods

- Location

Capture of adult *Culicoides* midges was conducted in a dairy farm located in Majorca (C'as Boter: 39° 30' N; 3° 7' S, Spain) where the presence of BTV vectors (e.g. *C. obsoletus*) was previously detected.

- Insect Collection

Culicoides midges were collected using two different light traps: the Onderstepoort trap (ARC-OVI, South Africa) and the Mini-CDC trap (John Hock Company, Gainesville, FL, EE.UU.) that were operated from dusk till dawn between April and June 2010. Midge survival was facilitated by excluding large insects from the collections using mosquito netting placed around the trap and a piece of roughly folded paper towel placed into the beaker to provide shelter for the trapped midges against the down-draught suction fan. Captures were collected early in the morning and taken to the insectary inside a thermal insulating container to avoid dehydration of the insects. *Culicoides* midges were transferred to WHO chambers in batches of ≈ 100 individuals and maintained with cotton pledgets imbibed with 5% sucrose solution. Midges were allowed to adapt to the insectary conditions (dim light environment at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 75-85% R.H.) during 24 h before starting each insecticide test.

- Insecticide susceptibility test

Insecticide sensitivity of several *Culicoides* species was assessed according to the standard WHO test procedure (WHO 1981b) (Barnard, 2005). Diagnostic dosages (0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005 and 0.01%) of deltamethrin were tested on impregnated papers for each bioassay (Figure 1). Insecticide-impregnated papers were supplied by the Vector Control Research Unit, Universiti Sains Malaysia (WHO collaborative Center) and consisted in filter papers (Whatman # 1, 90 g/m², 12 x 25 cm) impregnated with deltamethrin on acetone-silicone solution (2 ml per paper; 67% acetone, 33% silicone). Papers impregnated only with 2 ml acetone-silicone mixture without the insecticide were also supplied and used as control tests (World Health Organization (WHO), 1981).



Figure 1. WHO test used for the assessment of *Culicoides* sensitivity to deltamethrin with five different concentrations of insecticide (red dots) plus the control test (green dot)

Batches of ≈ 100 unsorted *Culicoides* were exposed horizontally during one hour to the different deltamethrin dosages inside the WHO chambers at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 75-85% R.H. After exposition the number of midges killed by the immediate action of the insecticide was counted. Midges still alive after insecticide exposure were transferred to clean WHO chambers and maintained with 5% sucrose solution in a dim light environment $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 75-85% R.H. After 24h, alive and dead *Culicoides* were counted again. To standardize age, only nulliparous females were considered.

If the mortality observed in the control groups laid between 5 and 20%, the mortality rate of the treatment groups was corrected applying the Abbot formula (Abbott, 1925). If mortality of control groups were $> 20\%$, tests were discarded. Data of the tested samples were pooled if mortality $< 5\%$ was noted for the control.

After the experience was over, the impregnated papers were wrapped and stocked at -20°C . All used chambers were soaked in a cleaning alkaline solution (Derquim LA 15) at least during 24 hours. All the material was washed separately; red doted and green doted tubes.

- Data analysis

All data was subjected to Probit analysis (Finney, 1971) with the program XLStat 2011 (Addinsoft) and the LC_{50} and LC_{90} were obtained ($P < 0.05$) (Raymond, 1985). Ld-P line was obtained with the analytic program Statplus 2009.

Results

A total of 2737 *Culicoides* midges belonging to ten different species (Obsoletus group (Meigen 1818), *C. circumscriptus* (Kieffer 1918), *C. newsteadi* (Austen 1921), *C. maritimes* (Kieffer 1924), *C. univittatus* (Vimmer 1932), *C. cataneii* (Clastrier 1957), *C. longipennis* (Khalaf 1957), *C. pictipennis* (Staeger 1839), *C. puncticollis* (Becker 1903) and *C. imicola* (Kieffer 1913)) were tested against the insecticide. Midges were assayed in batches of between 72.7 ± 30.7 and 114 ± 38.2 individuals and, depending on the insecticide concentration, three to seven replicates per test were conducted (Table 1).

Mean mortality in the control during the first 24h was $7.4 \pm 7.6\%$ (natural mortality). This data was used in the Abbot formula (Finney, 1949) to correct the mortality of the treatment groups.

Mean mortality observed after 1h exposure to deltamethrin was between $22.25 \pm 16.8\%$ (insecticide concentration 0,0001%) and $100 \pm 0\%$ (insecticide concentrations 0,005 and 0,01%) (Table 1).

Mortality at 24 h after the exposure to deltamethrin was between $41.9 \pm 18.4\%$ for the lowest concentration (0.0001%) and $100 \pm 0\%$ for the two highest concentrations (0.005 y 0.01%) (Table 1). The highest concentrations (0.005 and 0.01%) were assayed only three times each because mortality obtained was invariably 100%. For the rest of concentrations in which some survival rate was observed six (0.001%) or seven replicates (0.0005 and 0.0001%) were conducted (Table 1).

Table 1. Deltamethrin concentrations used for the bioassay. Number of individuals tested and means of mortality percentages at 1h and 24h after the assays with its standard deviations

Deltamethrin concentration (%)	\sum Assayed <i>Culicoides</i>	N	<i>Culicoides</i> Assayed $\bar{x} \pm$ S.D.	\bar{x} % mort \pm S.D. (1h)	\bar{x} % mort \pm S.D. (24h)
Control	485	7	69.3 ± 14.4	2.15 ± 3.8	7.4 ± 7.6
0.0001	525	7	$75 \pm 46,2$	22.25 ± 16.8	41.9 ± 18.4
0.0005	798	7	114 ± 38.2	79.8 ± 22.5	83.15 ± 17.8
0.001	489	6	81.5 ± 27.1	93.8 ± 8.1	94.8 ± 5.2
0.005	218	3	72.7 ± 30.7	100 ± 0	100 ± 0
0.01	222	3	74 ± 32.5	100 ± 0	100 ± 0

Results obtained after the correction of mortality with the Abbot formula indicated that deltamethrin Lethal Dose 50 (LD₅₀) for the *Culicoides* population assayed was 0.000145% and that LD₉₀ was 0.000579% (Figure 2). Slope values of the Dose-Probit Line (Ldp) showed homogeneity in population response (slope 2.11; $R^2 = 0.96$) to the insecticide treatment. Ldp is a straight line indicating a unimodal response of the *Culicoides* population to the treatments (Figure 3). Mortality rates obtained for the Obsoletus group were similar to those observed for the total population. For these vector species a LD₅₀ = 0.000174 and a LD₉₀ = 0.000576 was observed. No significant differences were observed in the mortality of Obsoletus group compared to the *Culicoides* total population assayed.

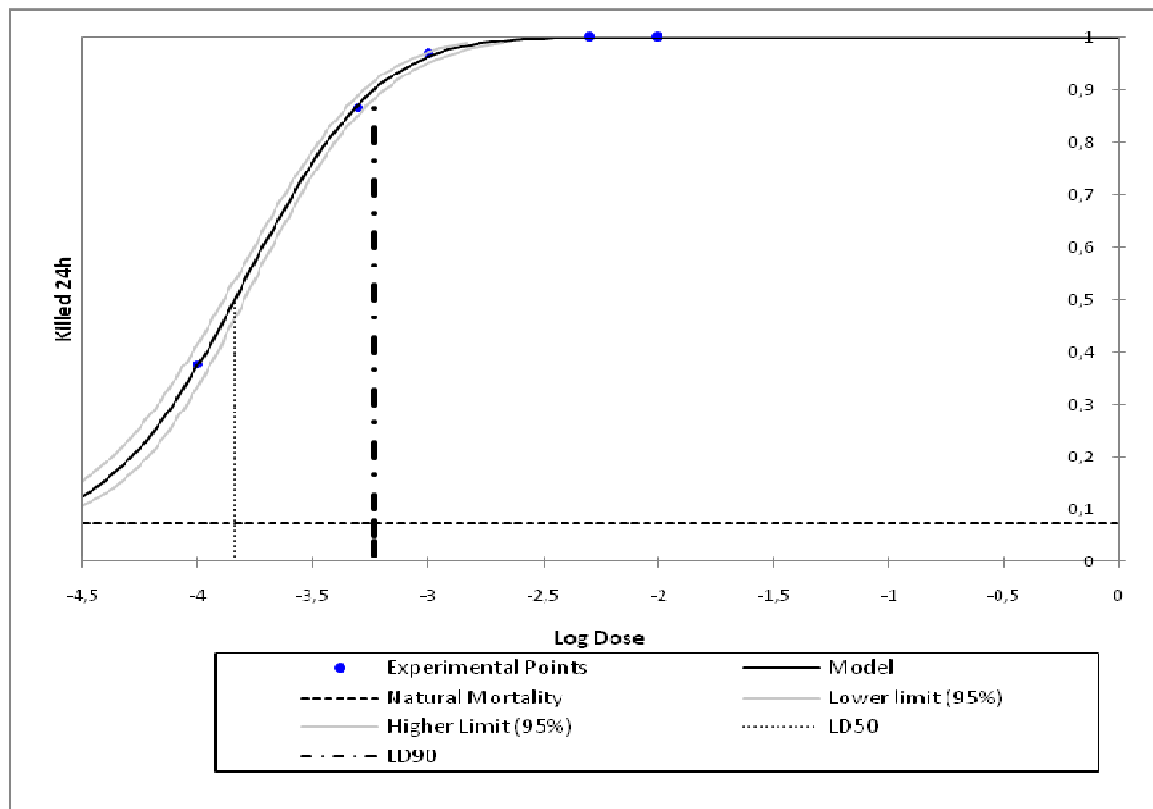


Figure 2. Distribution model of Mortality-Dose. Blue dots represent the mean mortality values obtained in the bioassay with a $P < 0.05$. Logarithm of the dose is represented on the X axis while mortality is represented on the Y axis. DL₅₀ and DL₉₀ are represented.

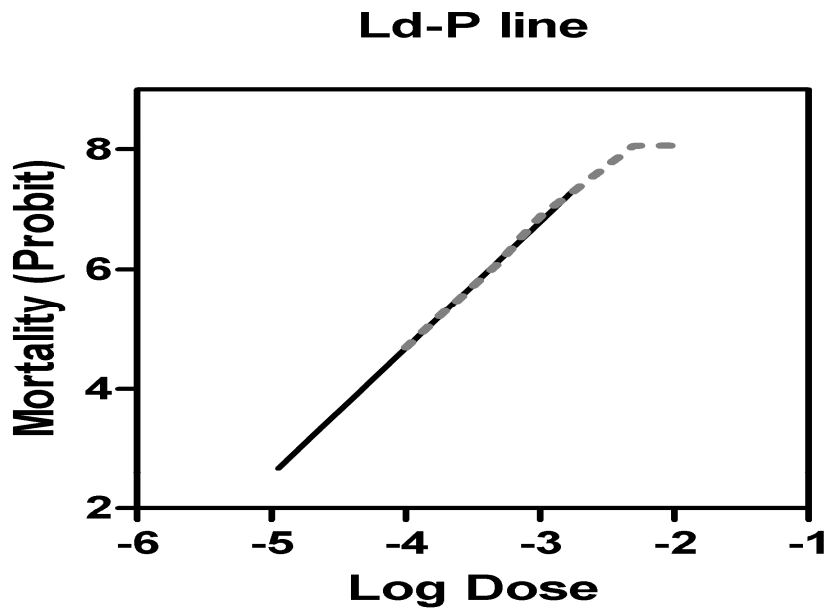


Figure 3. Dose-Probit Line (Ld-p) for evaluated treatments to control *Culicoides* populations. Dotted line (grey) represents the experimental points while solid line (black) represents the regression line (Ld-p)

The relative percentage of the *Culicoides* species assayed for insecticide susceptibility were; Obsoletus group (78.4%), *C. circumscriptus* (15.12%), *C. newsteadi* (3.65%), *C. maritimus* (0.86%), *C. univittatus* (0.82%), *C. cataneii* (0.58%), *C. longipennis* (0.27%), *C. pictipennis* (0.1%), *C. puncticollis* (0.1%) and *C. imicola* (0.07%). 2277 out of the 2904 assayed *Culicoides* belonged to the Obsoletus group. 793 individuals from this group were analysed via PCR to determine the species. Molecular analysis indicated that only five individuals (0.63%) belonged to the species *C. scoticus* while the rest (788 individuals; 99.37%) belonged to *C. obsoletus*.

Discussion

The results obtained in the present trial show that the *Culicoides* population assayed is highly susceptible to deltamethrin. The lowest concentration of this insecticide increased the mortality rate \approx 40% and concentrations \geq 0.005% killed the complete population in less than one hour. These results are in line with other bioassays conducted with this pyrethroid against the *Culicoides* midges (Mehlhorn *et al.*, 2008; Schmahl *et al.*, 2008a) and confirm the efficacy of this insecticide against *Culicoides* midges in laboratory conditions.

Probit analysis (Finney, 1971) can be used to characterize the response of a strain to a toxicant and establish the dose of insecticide necessary to kill a given percentage of treated individuals (Ferrari *et al.*, 1996). The strain is characterized by the doses or concentrations of insecticide that kill 50% (LD₅₀) and 90% (LD₉₀) of treated individuals. LD₅₀ and LD₉₀ values can be used to compare insecticide sensitivity in different species or in different strains of the same species. LD₅₀ obtained in the present bioassay was 0.000145% and LD₉₀ 0.000579% (Figure. 2) for the total population and LD₅₀ = 0.000174; LD₉₀ = 0.000576 for the *Obsoletus* group. A field population of the *Obsoletus* group tested by Venail *et al.* showed a LD₉₀ = 0.00203% 24 h after deltamethrin treatment (Venail *et al.*, 2011). The population of the *Obsoletus* group assayed in the present work were 3.5 times more susceptible to deltamethrin than the populations assayed by Venail *et al.*.

If cumulative percent mortality is transformed into probit units and plotted against the logarithm of dose of toxicant, a log-dose probit mortality (LD-P) line is obtained. The slope of the LD-P line is a measure of the variability of the strain. The steeper the slope, the more uniform the response of individuals to insecticide concentration. The slope obtained (2.11) reflected relatively minor variation among individuals and a high susceptibility of the *Culicoides* population in response to the insecticide treatment. Lack of tolerance was observed in the different tests and response to the insecticide was uniform as the regression model shows in Figure 3. The response of the *Culicoides* populations to a given insecticide resulting from the farm practices is not well known. Insecticides like permethrin, fenvalerate or cyfluthrin offer the same toxic effects as deltamethrin when applied with spray or *pour-on* formulations (Mehlhorn *et al.*, 2008a; Mehlhorn *et al.*, 2008b; Schmahl *et al.*, 2008a; Schmahl *et al.*, 2008b) and could be used alternatively on the animals to avoid resistance development in the *Culicoides* populations to a given toxicant.

Venail *et al* showed that *C. obsoletus* and *C. imicola* were highly sensitive to deltamethrin when assayed in laboratory with the WHO tests. However, the same species seemed to be tolerant to the insecticide in field trials (Venail *et al.*, 2011). The reason of this lower efficacy of the insecticide in field conditions could be partly ascribed to the heterogeneous distribution of the insecticide on the treated animals. When the insecticide

is to be applied over the animal the way of application should be taken into account since some parts of the animals could be left uncovered (e.g. belly, legs, muzzle), specially with *pour-on* applications (Mullens *et al.*, 2000; Carpenter *et al.*, 2007) or ear tags (Liebisch & Liebisch, 2008; Schmahl *et al.*, 2009) and those parts can become the predominant biting sites of the *Culicoides* midges (Nielsen *et al.*, 1988; Stendel *et al.*, 1992). To avoid problems with the distribution of the insecticide, subcutaneous injections of ivermectines (macrocyclic lactone) has been tested (Standfast *et al.*, 1984). However, traces of the insecticide were found in the droppings of treated animals and raised environmental concerns. Moreover, the discovering of intestinal nematodes with multiple tolerances to avermectines in Scottish sheep called the benefits of this insecticide into question (Strong, 1992). Immersion treatments could be also applied but, due to the potential negative effect on the environment and human health (Jess *et al.*, 2007), these kind of treatments are not considered as good candidates to be approved by the European legislation. The application of insecticide with spray could avoid distribution problems over the animal but is highly time consuming. In this respect, the use of insecticide treated nets offers an easy alternative to control *Culicoides* populations even though further research in field conditions needs to be conducted. For the mentioned reasons it is unlikely that insecticide treatments could offer 100% protection to the animals. However, every *Culicoides* bite avoided will prevent the potential transmission of the BTV. Thus, Insecticide treatments are advisable when an outbreak of the disease is detected in a region.

The present study was conducted at $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. In these conditions the deltamethrin bioassays should offer reliable results (Hodjati and Curtis, 1999). In field conditions the effect of the insecticide at temperatures $>28^{\circ}\text{C}$ should be considered since pyrethroids have negative temperature coefficients of toxicity (lower toxicity at higher temperature) (Hodjati and Curtis, 1999). During the summer season, temperatures of southern Europe often rise over 30°C and are maintained during most part of the day and the results of the insecticide assays obtained in field could differ from those obtained in the laboratory in controlled conditions. The assessment of deltamethrin in laboratory conditions at different temperatures should be conducted in future experiments since this could lead to the knowledge of the dose needed in high temperature conditions in the field to control *Culicoides* populations. The continuous application of sub-lethal doses of pyrethroids in the field could result, in short time, to resistance development (Jandowsky *et al.*, 2009).

The environmental temperature is also to be held into consideration since Tests in the present bioassay were conducted in the range of 22-28°C and should give reliable results. However, Thus, it is unlikely that pyrethroids treatments could offer 100% protection to the animals (Tiawsirisup *et al.*, 2007). However, by decreasing the biting rate of the midges the infection rate is also affected and could prevent transmission of BTV disease (Schmahl *et al.*, 2009)

The results obtained in the present trial show that the *Culicoides* population assayed is highly susceptible to deltamethrin treatments and no resistance phenomena seemed to be developed among individuals of the different species. The sensitivity of *C. imicola* (main vector of BTV in Europe and Africa) to the insecticide should be assessed in next experiments. Lethal doses of deltamethrin (>0.0001%) applied on animals or impregnated on nets should also be conducted in field trials to assess the potential of this pyrethroid in the control of *Culicoides* populations and transmission of BTV disease.

Acknowledgments

This study was partly initiated by the European Union as part of a project entitled ‘Surveillance Network of Reoviruses, Bluetongue and African Horse Sickness, in the Mediterranean basin and Europe’ (MedReoNet) (contract no. 044285). We also thank the *Conselleria d’Innovació, Interior i Justícia* and the national project ‘*Estudio de la Competencia Vectorial de las Especies de Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) Vectores de la Lengua Azul en España y Evaluación de la Hibernación del Virus en los Vectores*’ for financial support.

References

Abbott, W.S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, **18**, 265-267.

Balenghien, T. (2008) *Culicoides chiopterus*: Confirmation of its status as potential vector of Bluetongue virus in Europe. *ProMed-mail*. International Society for Infectious Diseases, Brookline, MA.

Barnard, D.R. (2005) Biological assay methods for mosquito repellents. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **21**, 12-16.

Boorman, J., Jennings, M., Mellor, P.S., Wilkinson, P., Barber, T.L. & Jochim, M.M. (1985) Further data on the distribution of biting midges in southern Europe and the Mediterranean area, with special reference to *C. imicola*. *Bluetongue and Related Orbiviruses* pp. 187-190. New York, Alan R. Liss Inc.

Caracappa, A., Torina, A., Guercio, A., Vitale, F., Calabrò, A., Purpari, G., Ferrantelli, V., Vitale, M. & Mellor, P.S. (2003) Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *The Veterinary Record*, **153**, 71-74.

Carpenter, S., Mellor, P. & Torr, S. (2007) Bluetongue and midge control. *Veterinary Record*, **161**, 633.

Conraths FJ, Kramer M, Freuling C, Hoffmann B, Staubach C, Gethmann J, Teifke J, Mettenleiter TC, Beer M (2007) Bluetongue disease in Germany: clinical aspects, diagnosis and epidemiology. *Prakt Tierarzt* 88:9–15

De Liberato, C., Scavia, G., Lorenzetti, R., Scaramozzino, P., Amaddeo, D., Cardeti, G., Scicluna, M.T., Ferrari, C. & Autorino, G.L. (2005) Identification of *Culicoides obsoletus* (Diptera : Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus un central Italy. *Veterinary Record*, **156**, 301-304.

Dijkstra, E., Van Der Ven, I.J.K., Meiswinkel, R., Hölzel, D.R. & Van Rijn, P.A. (2008) *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Record*, **162**, 422

EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). (2008) Scientific opinion of the panel on animal health and welfare. Bluetongue vectors and insecticides. *The EFSA Journal* (2008) **735**, 1-70

Ferrari, J.A., Beaty, B.J. & Marquardt, W.C. (1996) Insecticide resistance. *The Biology of Disease Vectors*. 512-529. University Press of Colorado

Finney, D. (1971) Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, UK

Finney, D.J. (1949) The adjustment for a natural response rate in probit analysis. *Annals of Applied Biology*, **36**, 187-195.

Floore, T.G. (1985) Laboratory wind tunnel tests of nine insecticides against adult *Culicoides* species (diptera: Ceratopogonidae). *Florida Entomologist*, 678-682.

Hill, M.A. & Roberts, E.W. (1947) An investigation into effects of gammexane on the larvae, pupae and adults of *Culicoides impunctatus* Goetghebuer and on the adults of *Culicoides obsoletus* Meigen. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **41**, 143-163.

Hodjati MH, Curtis CF. (1999) Effects of permethrin at different temperatures on pyrethroid-resistant and susceptible strains of *Anopheles*. *Medical and Veterinary Entomology*, **13**: 415-22.

Jandowsky, A., Schein, E., Clausen, P.H., Sievert, K. & Bauer, B. (2009) Vorkommen und verbreitung von insektizidresistenzen bei fliegen (*Musca domestica* L.) in milchviehbetrieben brandenburgs. In, *Tagung Der DVG-Fachgruppe "Parasitologie Und Parasitäre Krankheiten"*, Leipzig, Pp. 47-48

Jess, S., Kearns, C. & Matthews, D.I. (2007) A survey of annual pesticide usage during the control of sheep ectoparasites in northern Ireland, 2005. *Journal of Agricultural Science*, **145**, 517

Kline, D.L. & Roberts, R.H. (1981) Effectiveness of chlorpyrifos, fenthion, malation, and propoxur as screen treatments for control of *Culicoides mississippiensis*. *Journal of Economical Entomology*, **74**, 331-333

Liebisch, G. & Liebisch, A. (2008) Efficacy of flectron-ear tags (cypermethrin) for control of midges (*Culicoides*) as the vectors of bluetongue virus in cattle: Field studies and bioassays. *DTW.Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **115**, 220-230

Mehlhorn, H., Schmahl, G., D'Haese, J. & Schumacher, B. (2008a) Butox® 7.5 pour on: A deltamethrin treatment of sheep and cattle: Pilot study of killing effects on *Culicoides* species (ceratopogonidae). *Parasitology Research*, **102**, 515-518.

Mehlhorn, H., Schmahl, G., Schumacher, B., D'Haese, J., Walldorf, V. & Klimpel, S. (2008b) Effects of bayofly™ on specimens of *Culicoides* species when incubated in hair taken from the feet of previously treated cattle and sheep. *Parasitology Research*, **102**, 519-522.

Mehlhorn, H., Walldorf, V., Klimpel, S., Jahn, B., Jaeger, F., Eschweiler, J., Hoffmann, B. & Beer, M. (2007) First occurrence of *Culicoides obsoletus*-transmitted bluetongue virus epidemic in central Europe. *Parasitology Research*, **101**, 219-228.

Mehlhorn, H., Walldorf, V., Klimpel, S., Schaub, G., Kiel, E., Focke, R., Liebisch, G., Liebisch, A., Werner, D. & Bauer, C. (2009) Bluetongue disease in Germany (2007–2008): Monitoring of entomological aspects. *Parasitology Research*, **105**, 313-319.

Mehlhorn, H., Walldorf, V., Klimpel, S. y Schmahl, G. (2008) Outbreak of bluetongue disease (BTD) in Germany and the danger for Europe. *Parasitology Research*, **103** (1), 79-86.

Meiswinkel, R., van Rijn, P., Leijts, M. & Goffredo, M. (2007) Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *The Veterinary Record*, **161**, 564-565.

Meiswinkel, R., Baldet, T., De Dekken, R., Takken, W., Delécolle, J.C. & Mellor, P.S. (2008) The 2006 outbreak of bluetongue in northern Europe. The entomological perspective. *Preventive Veterinary Medicine*, **87**, 55-63.

Mellor, P.S., Jennings, D.M., Wilkinson, P.J. y Boorman, J. (1985) *Culicoides imicola* : A Bluetongue virus vector in Spain and Portugal. *Veterinary Record*, **116**, 589–590.

Mullens, B.A., Velten, R.K., Gerry, A.C., Braverman, Y. & Endris, R.G. (2000) Feeding and survival of *Culicoides sonorensis* on cattle treated with permethrin or pirimiphos - methyl. *Medical and Veterinary Entomology*, **14**, 313-320.

Nielsen, B.O., Nielsen, S.A. & Jespersen, J.B. (1988) The fauna of diptera visiting tethered heifers in Danish pastures. *Entomologiske Meddelelser (Denmark)*, **56**, 79-88.

Ortega, M.D., Mellor, P.S., Rawlings, P. & Pro, M.J. (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*, **14**, 85-91.

Raymond, M. (1985) Presentation d'un programme basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cah.ORSTOM Ser.Entomol.Med.Parasitol*, **23**, 117-121.

Saegerman C, Berkvens D, Mellor PS (2008) Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerging Infectious Disease*, **14**, 539–544

Schmahl, G., Klimpel, S., Walldorf, V., Schumacher, B., Jatzlau, A., Al-Quraishy, S. & Mehlhorn, H. (2009) Effects of permethrin (flypor®) and fenvalerate (acadrex® 60, arkofly®) on *Culicoides* species—the vector of bluetongue virus. *Parasitology Research*, **104**, 815-820.

Schmahl, G., Sven, K., Walldorf, V., Al-Quraishi, S., Schumacher, B., Jatzlau, A. y Melhorn, H. (2008) Pilot study on deltamethrin treatment (butox© 7.5, versatrine©) of cattle and sheep against midges (*Culicoides* species, ceratopogonidae). *Parasitology Research*, **104** (4), 809-813.

Service, M.W. (1969) Studies on the biting habits of *Culicoides impunctatus* Goetghebuer, *C. obsoletus* (Meigen) and *C. punctatus* (Meigen) (diptera: Ceratopogonidae) in southern England. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology*, **44**, 1-10.

Standfast, H.A., Muller, M.J. & Wilson, D.D. (1984) Mortality of *Culicoides brevitarsis* (diptera: Ceratopogonidae) fed on cattle treated with ivermectin. *Journal of Economic Entomology*, **77**, 419-421.

Stendel, W., Hamel, H.D., Sieveking, H.U. & Brühne, D. (1992) Analytical determination of the distribution of flumethrin on the body surface of cattle following topical pour-on application. *Veterinary Parasitology*, **42**, 137-143.

Stephan, A., Clausen, P.H., Bauer, B. & Steuber, S. (2009) PCR identification of *Culicoides dewulfi* midges (diptera: Ceratopogonidae), potential vectors of bluetongue in Germany. *Parasitology Research*, **105**, 367-371.

Strong, L. (1992) Avermectins: A review of their impact on insects of cattle dung. *Bulletin of Entomological Research*, **82**, 265-274.

Tiawsirisup, S., Nithiuthai, S. & Kaewthamasorn, M. (2007) Repellent and adulticide efficacy of a combination containing 10% imidacloprid and 50% permethrin against *Aedes aegypti* mosquitoes on dogs. *Parasitology Research*, **101**, 527-531.

Vanbinst, T., Vandenbussche, F., Vandemeulebroucke, E., De Leeuw, I., Deblauwe, I., De Deken, G., Madder, M., Haubruge, E., Losson, B. & De Clercq, K. (2009) Bluetongue virus detection by real-time RT-PCR in *Culicoides* captured during the 2006 epizootic in

belgium and development of an internal control. *Transboundary and Emerging Diseases*, **56**, 170-177.

Venail, R., Mathieu, B., Setier-Rio, M.L., Borba, C., Alexandre, M., Viudes, G., Garros, C., Allene, X., Carpenter, S. & Baldet, T. (2011) Laboratory and field-based tests of deltamethrin insecticides against adult *Culicoides* biting midges. *Journal of Medical Entomology*, **48**, 351-357.

World Health Organization (WHO). (1981) Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult blackflies, sandflies and biting midges to insecticides: Mimeographed document (WHO/VBC/81.810). *World Health Organization*, Geneva, Switzerland.

9.4 Formación Científica Durante el Periodo de Tesis

Publicaciones relacionadas

- **del Río R.**, Miranda M.A., Paredes-Esquivel C., Lucientes J., Calvete C., Estrada R. y Venter G.J. (2012) Recovery rates of bluetongue virus serotype -1, -2, -4 and -8 Spanish strains from orally infected *Culicoides imicola* in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology*, **26**, 162-167

- Venter G.J., Wright I.M., **del Río R.**, Lucientes J. y Miranda M.A. (2011) The susceptibility of *Culicoides imicola* and other South African livestock-associated *Culicoides* species to infection with bluetongue virus serotype 8, *Medical and Veterinary Entomology*, **25**, 320-326

- Borràs D., Lucientes J., **del Río R.**, Rincón C. y Miranda M.A. (2011) Deu anys de vigilància entomològica enfront a la llengua blava. *Revista del Col.legi Oficial de Veterinaris de les Illes Balears* **49**, 16

- Calvete C., Estrada R., Miranda M.A., **del Río R.**, Borràs D., Beldrón F.J., Martínez A., Calvo A. y Lucientes J. (2010) Protection of livestock against bluetongue virus vector *Culicoides imicola* using insecticide-treated netting in open areas. *Medical and Veterinary Entomology*, **24**, 169-175

- Calvete C., Estrada R., Miranda M.A., **del Río R.**, Borràs D., Beldrón F.J., Martínez A., Calvo A. y Lucientes J. (2009) Entry of bluetongue vector *Culicoides imicola* into livestock premises in Spain. *Medical and Veterinary Entomology* **23**, 202–208

- Calvete C., Estrada R., Miranda M.A., **del Río R.**, Borràs D., Garrido L., Muñoz B., Romero L.J. y Lucientes J. (2009) Evaluación de la eficacia de monitorización de las poblaciones de vectores de lengua azul, *Culicoides imicola* Kieffe, 1913 y complejo *Culicoides obsoletus* Meigen, 1818 (Diptera; Ceratopogonidae), en España. *ITEA*, **105** (3), 147-160

- Lucientes J., Calvete C., Miranda M.A., Estrada R., Borràs D. y **del Río R.** (2008) La lengua azul: Una enfermedad infecciosa de los rumiantes domésticos que puede afectar a los silvestres. *Accazadores*, **12**, 50-53

Otras publicaciones

- Paredes C., **del Río R.**, Monerris M., Borràs D., Laglera L.M. y Miranda M.A. (2012) The influence of sheep age group on the seasonal prevalence of oestrosis in the island of Majorca. *Veterinary Parasitology*, **186** (3-4), 538-541

- Paredes C., **del Río R.**, Monerris M., Martí T., Borràs D. y Miranda M.A. (2009) High prevalence of myiasis by *Oestrus ovis* in the Balearic Islands. *Parasite*, **16**, 323-324

- Janssens T., **del Río R.**, Mariën J., Timmermans M., Montagne-Wajer K., Van Straalen N. y Roelofs D. (2008) *Environmental Science and Technology*, **42**, 3873-3878

Contribuciones a Congresos

- Comunicaciones Orales

- del Río R., Miranda M.A., Venter G. y Baylis M. (2010) Recommendation of the optimal trap design for sampling *Culicoides*. 4th *MedReoNet Meeting*, Palma de Mallorca, España

- del Río R., Venter G.J., Miranda M.A., Paredes-Esquivel C., Lucientes J., Calvete C. y Estrada R. (2009) Virus recovery rate of BTV-1, -2, -4 and -8 Spanish strains in orally infected *C. imicola* in South Africa. 3rd *MedReoNet Meeting*, Lisboa, Portugal

- del Río R., Miranda M.A., Borràs D., Calvete C., Estrada R. y Lucientes J. (2008) *Culicoides* trap comparison in the Balearic Islands. 2nd MedReoNet Meeting, Teramo, Italia

- del Río R., Miranda M.A., Borràs D., Calvete C., Estrada R. y Lucientes J. (2008) Comparación de trampas para la entomovigilancia de los vectores de la lengua azul (Diptera; Ceratopogonidae) en las Islas Baleares. Jornades de Medi Ambient de les Illes Balears. Palma de Mallorca, España

- del Río R., Miranda M.A., Borràs D., Calvete C., Estrada R. y Lucientes J. (2007) *Culicoides* trap comparison in the Balearic Islands. 1st MedReoNet Meeting. Palma de Mallorca, España

- Pósters

- del Río R., Monerris M., Miranda M.A., Calvete C., Borràs D., Miquel M., Estrada R. y Lucientes J. (2009) Diferencias en el ratio para/nulípara en hembras de *Culicoides* spp. capturadas en tres tipos distintos de trampas en las Islas Baleares. VI Congreso Nacional de Entomología Aplicada XII Jornadas Científicas de la SEEA, Palma de Mallorca, España

- del Río R., Monerris M., Miranda M.A., Calvete C., Borràs D., Miquel M., Estrada R. y Lucientes J. (2008) Traps used in different European countries for the monitoring of vectors of Bluetongue (BT) and African Horse Sickness (AHS). International Congress of Entomology, Durban, Sudáfrica

- Participaciones

- Mesa Redonda (2011) EdeNext Meeting, Budapest, Hungría

- Mesa Redonda (2011) EdeNext Meeting, Montpellier, Francia
- Mesa Redonda (2010) *MedReoNet Meeting*, Tunisia, Túnez

Estancias en Centros de Investigación

- Onderstepoort Veterinary Institute (OVI) (Pretoria; Sudáfrica), *Febr-Abril 2008*
- Centre Internationaux de Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) (Montpellier; Francia), *Sept. 2008*
- Onderstepoort Veterinary Institute (OVI) (Pretoria; Sudáfrica), *Febr-Abril 2011*