

Evaluación de la eficacia del programa de monitorización de las poblaciones de vectores de lengua azul, *Culicoides imicola* Kieffer, 1913 y complejo *Culicoides obsoletus* Meigen, 1818 (Diptera: Ceratopogonidae), en España

C. Calvete^{1*}, R. Estrada^{**}, M.A. Miranda^{***}, R. Del Rio, D. Borrás^{****}, L. Garrido^{*****}, B. Muñoz^{*****}, L.J. Romero^{*****}, J. Lucientes^{**}

* Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza.

** Departamento de Patología Animal. Universidad de Zaragoza. Zaragoza.

*** Laboratorio de Zoología. Universidad de las Islas Baleares. Palma de Mallorca.

**** Instituto de Biología Animal de las Baleares.

***** Subdirección General de Sanidad de la Producción Primaria. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid.

¹ Autor para correspondencia: Tel. 976 716453; Fax 976 716335; e-mail: ccalvete@aragon.es

Resumen

La lengua azul es una enfermedad viral que afecta a rumiantes domésticos y silvestres y que es transmitida principalmente por diferentes especies del género *Culicoides* (Latreille, 1809). En la actualidad, la lengua azul está todavía en fase de expansión en la España peninsular en donde se considera que los principales vectores implicados en su transmisión son *Culicoides imicola* (Kieffer, 1913) y el complejo de especies *Culicoides obsoletus* (Meigen, 1818). En 2004 se puso en marcha un programa nacional de vigilancia entomológica con el objetivo de monitorizar las poblaciones de estos vectores. En el presente trabajo se hace un primer análisis de las características del plan de muestreo y de los resultados obtenidos hasta la fecha. El área de monitorización considerada, que comprende España peninsular e islas Baleares, se ha dividido en dos estratos diferenciados en base a criterios biológicos (principalmente variaciones en la dinámica poblacional de ambos vectores) y territoriales (límites provinciales y regionales). Se ha comprobado que a escala nacional los patrones de variación de las poblaciones de ambos vectores son coincidentes con los patrones descritos en trabajos anteriores realizados a escala local o regional, y que la precisión (en tanto por uno) alcanzada en estas estimas (utilizando la ley de Taylor) ha oscilado entre el 0,21 y el 0,12. Cálculos realizados en base a la misma ley han sugerido que reduciendo a la mitad aproximadamente el actual esfuerzo de muestreo sería todavía posible alcanzar niveles de precisión comprendidos entre 0,25 y 0,35, considerados suficientes para detectar cambios con significación biológica en la abundancia de los vectores.

Palabras clave: *Culicoides*, España, lengua azul, vigilancia entomológica

Summary

Evaluation of the monitoring programme of populations of the bluetongue vectors *Culicoides imicola* Kieffer, 1913 and *Culicoides obsoletus* complex Meigen, 1818 (Diptera: Ceratopogonidae) in Spain
Bluetongue is a viral disease that is mainly transmitted among their vertebrate hosts (mainly ruminants) by several species of biting midges of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). Currently, bluetongue is still spreading across peninsular Spain where the main vector species incriminated in viral transmission are *Culicoides imicola* and species of the *C. obsoletus* complex. A national surveillance programme was started in 2004 to monitor bluetongue vector populations at weekly

intervals. In the present work, the performances and design of the monitoring sampling are revised. Monitoring area, comprising peninsular Spain and Balearic Islands, was divided in two strata on the basis on biological (population dynamics of both vector species) and geographical (provincial and regional boundaries) criteria. Estimated patterns of population variability for both *Culicoides* species at national scale were similar to patterns reported in previous works at local or regional scale. Using the Taylor's power law, the precision level currently reached by the monitoring programme ranged from 0.21 to 0.12, however, precision levels ranging from 0.25 to 0.35, which are considered an amount of variation that would still allow biologically significant abundance differences to be apparent, would be reached by, approximately, halving the current sampling effort.

Key words: Bluetongue, *Culicoides*, entomological surveillance, Spain

Introducción

La lengua azul es una enfermedad infecciosa producida por un virus perteneciente al género *Orbivirus*, el cual presenta una amplia distribución geográfica a escala mundial. El principal interés de esta enfermedad radica en el grave impacto que puede ocasionar en la rentabilidad de la ganadería de rumiantes domésticos debido a su elevada morbilidad y, en ocasiones, mortalidad, dependiente tanto del serotipo implicado como de la especie y raza afectada (Taylor, 1986). Este virus, que cuenta en la actualidad con 24 serotipos diferentes reconocidos, se transmite entre sus hospedadores vertebrados a través de la picadura de dípteros del género *Culicoides* (Latreille, 1809; Du Toit, 1944; Mellor y Pitzolis, 1979), lo que implica que el conocimiento de la biología, distribución y dinámica poblacional de las especies de vectores implicadas es un factor esencial para caracterizar la epidemiología de la enfermedad y establecer las correspondientes estrategias de control.

Históricamente, la Península Ibérica y, más recientemente, las Islas Baleares han sufrido incursiones esporádicas de esta enfermedad (Manso-Ribeiro et al., 1957; Miranda et al., 2003). No obstante, en el año 2004 se inició una nueva epizootia de lengua azul afectando a la España peninsular que todavía sigue activa en la actualidad y en la que se han

visto implicados varios serotipos del virus. Desde entonces, el actual Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino de España (MARM) puso en marcha un programa de vigilancia entomológica a escala nacional con el fin de caracterizar la distribución de las poblaciones de vectores (Calvete et al., 2006) y monitorizar su abundancia.

En sus inicios, el diseño de este programa estuvo orientado eminentemente a la monitorización de *Culicoides imicola* (Kieffer, 1913), especie distribuida principalmente por el cuadrante suroeste de la Península Ibérica y que, históricamente, ha sido considerada el principal vector de lengua azul en esa área (Mellor et al., 1983; Ortega et al., 1997; Calvete et al., 2008b). No obstante, la implicación del complejo de especies *Culicoides obsoletus* (Meigen, 1818) en la transmisión de algunos serotipos de lengua azul en Europa (Purse et al., 2007) y también en España (Calvete et al., 2008a) motivó la ampliación del programa de vigilancia con el objetivo de monitorizar también las poblaciones de este complejo de especies en nuestro país.

Los programas de vigilancia entomológica son herramientas indispensables para la monitorización, control y toma de decisiones sobre numerosas enfermedades transmitidas por vectores. Este tipo de actuaciones conllevan unos elevados costes de ejecución, por lo que es necesario revisar periódicamente su

diseño y resultados con el fin de ajustar los recursos a los objetivos del programa de vigilancia o, al menos, caracterizar el nivel de precisión alcanzado con los esfuerzos que es factible aplicar. El objetivo del presente trabajo es revisar los resultados alcanzados hasta ahora por el programa de vigilancia entomológica de los vectores de lengua azul promovido por el MARM y, basándose en aquellos, optimizar su implementación en el futuro diferenciando los posibles estratos geográficos de interés y estableciendo los esfuerzos de muestreo necesarios en cada uno de ellos para alcanzar niveles de precisión suficiente en las estimas de abundancia de las poblaciones de vectores en nuestro país.

Materiales y Métodos

Programa de vigilancia entomológica

El programa de vigilancia entomológica consistió en la realización de una captura semanal utilizando trampas CDC (Miniature Blacklight model 1212, John Hock Company, Gainesville, FL, EEUU). Este tipo de trampas está dotado de luz ultravioleta y se considera una herramienta estándar para la monitorización de las poblaciones de *Culicoides* (Mellor et al., 2004). Durante cada sesión de trampeo, de una noche de duración, las trampas se activaron y desactivaron al anochecer y al amanecer respectivamente con el fin de realizar la captura únicamente durante el período de máxima actividad de *Culicoides*. Cada trampa se ubicó de forma permanente en una misma localidad o municipio y en las proximidades de una instalación ganadera, con el fin de estimar las variaciones mensuales de abundancia de *Culicoides*.

La disposición geográfica de las estaciones de muestreo se intentó ajustar en sus principios a una distribución homogénea, basada en una retícula de cuadrículas de 50x50km.

No obstante, condicionantes logísticos, económicos o de interés epidemiológico de determinadas áreas, supusieron algunas desviaciones del diseño inicial, de tal manera que en algunas áreas la intensidad de muestreo fue mayor de la inicialmente prevista. Pese a estas desviaciones, la distribución final se pudo considerar representativa de todo el territorio nacional (figura 1B).

El programa de monitorización comenzó en el año 2004, sin embargo debido al reducido número de estaciones de muestreo que fueron funcionales al inicio del programa, para el presente análisis se tuvo en cuenta únicamente los datos de capturas recogidos entre agosto de 2005 y julio de 2008. Durante este período, el número de trampas o estaciones permanentes de muestreo que conformó la red nacional de monitorización (excluyendo las Islas Canarias) osciló entre las 160 y las 190 entre los años 2005 y 2007, llegando a las 231 en la primavera-verano de 2008 debido al incremento de estaciones de monitorización en el norte de España como consecuencia de la expansión de la lengua azul por esta área. No obstante, el número de datos efectivos sobre abundancia de *Culicoides* que se obtuvieron cada semana fue siempre inferior al número de estaciones de muestreo, ya que, por problemas variados como falta de personal, imposibilidad de acceso temporal a los lugares de muestreo, accidentes, errores durante el muestreo, problemas técnicos, etc, un porcentaje variable de estaciones no fue funcional en cada muestreo. Por ejemplo, de las casi 200 estaciones como media, que funcionaron entre junio de 2007 y julio de 2008, el número de datos efectivos obtenidos en cada sesión de muestreo osciló entre 150-180.

Identificación de las especies de *Culicoides*

Los ejemplares capturados por cada trampa y sesión de captura, fueron conservados en etanol al 70% y remitidos al laboratorio,

donde se procedió a la identificación de las diferentes especies de interés. En el presente trabajo, se analizaron únicamente los datos de abundancia de los principales vectores implicados en la transmisión del virus de lengua azul, *C. imicola* y el complejo de especies *C. obsoletus*. En España este complejo ha comprendido históricamente cuatro especies que se distribuyen geográficamente de una manera muy similar en nuestro país: *C. obsoletus* sensu stricto, *C. scoticus* (Downes y Kettle, 1952), *C. montanus* (Schakirzjanova, 1962) y *C. dewulfi* (Goetghebuer, 1936). Esta última especie fue recientemente clasificada como una especie diferente del complejo *C. obsoletus* (Meiswinkel et al., 2004), no obstante, debido a la gran dificultad (si no imposibilidad) para diferenciar las cuatro especies en base a las características morfológicas de las hembras (que son los individuos capturados mayoritariamente por las trampas de luz ultravioleta) y al hecho de que *C. dewulfi* haya sido también denunciado como un vector potencial del virus de lengua azul (Meiswinkel et al., 2007), laboratorialmente no se procedió a la diferenciación de esta especie, por lo que en el presente trabajo el complejo *C. obsoletus* siguió comprendiendo las cuatro especies anteriormente citadas.

Estimación de los estratos geográficos

El número de estaciones permanentes necesarias para monitorizar con un determinado nivel de precisión las poblaciones de *Culicoides* puede variar geográficamente debido a diferencias espaciales en la abundancia, grado de agregación o dinámica poblacional de las especies a monitorizar. La división del área muestreada en estratos dentro de los cuales estos parámetros sean más homogéneos, es recomendable para obtener mejores estimas del tamaño muestral necesario en cada estrato. En el presente trabajo esta estratificación se realizó mediante un análisis cluster en el que se utilizaron como variables de agrupamiento las abundancias medias anuales de ejemplares de *C. imicola* y del complejo *C. obsoletus* capturados en cada estación y su coeficiente de variación (CV) intra-anual, considerado éste como un indicador de la estacionalidad o amplitud de las variaciones en abundancia a lo largo del año. También, y con el objetivo de obtener estratos geográficamente contiguos, en el análisis cluster se incluyeron como variables de agrupamiento las coordenadas geográficas de cada estación de muestreo. Para esta estimación se excluyeron todas aquellas estaciones que, dentro de un mismo año de funcionamiento, en algún momento no fueron funcionales durante tres semanas consecutivas o más.

Estimación del tamaño de muestra requerido y niveles de precisión

Para la estimación del tamaño muestral se procedió al cálculo de la varianza (s^2) y la media (m) del número de ejemplares de *C. imicola* y del complejo *C. obsoletus* capturados en todas las estaciones funcionales de un mismo estrato en cada muestreo semanal. Posteriormente, la relación de ambos parámetros fue estimada en base a la ley de Taylor (Taylor, 1961), expresada por la siguiente fórmula $s^2 = am^b$, la cual puede ser transformada logarítmicamente a la ecuación lineal $\log_{10}(s^2) = \log_{10}(a) + b\log_{10}(m)$. El ajuste de esta ecuación mediante un modelo de regresión lineal proporciona estimaciones para $\log_{10}(a)$ o intersepto y para b o pendiente de la recta. El valor de a es un factor de escala dependiente del tamaño muestral mientras que b es una medida de la agregación de las poblaciones de la especie analizada, de tal manera que valores de b inferiores, próximos o superiores a 1 indican distribuciones uniformes, al azar o agregadas, respectivamente, de las poblaciones (Taylor, 1961).

Idealmente la estimación de los parámetros a y b debería ser realizada a partir de series de datos que sean completas tanto espacial como temporalmente (es decir, que las estaciones de muestreo sean siempre las mismas y que todas hayan proporcionado datos de capturas durante todo el periodo de monitorización), ya que de lo contrario el ajuste del modelo de regresión lineal puede verse afectado, disminuyendo la exactitud y precisión de las estimas de ambos parámetros. En el presente trabajo, sin embargo, se optó por utilizar los datos de todas las estaciones permanentes, incluidas aquellas con series anuales de datos incompletas, ya que se consideró que debido a las numerosas ocasiones en que alguna estación no fue funcional en algún muestreo, la utilización únicamente de los datos de estaciones con series completas habría supuesto una reducción drástica del tamaño muestral.

Los valores de a y b fueron estimados para cada uno de los vectores en cada uno de los estratos. Para la asignación a uno u otro estrato de las estaciones con series anuales incompletas (que no fueron usadas en el análisis cluster) se tuvo en cuenta la provincia en la que estuvieron localizadas, de tal manera que fueron asignadas al mismo estrato que las estaciones con datos anuales completos de la misma provincia. En el caso de estaciones con series incompletas localizadas en provincias sin ninguna estación con serie completa, aquellas fueron asignadas a uno u otro estrato de forma discrecional, teniendo en cuenta tanto la distribución y abundancia predicha para ambos vectores en Calvete et al. (2008c) como la comunidad autónoma a la que pertenecía la provincia en la que estuvieron localizadas. Se consideró que estas pautas de asignación a uno u otro estrato fueron las más adecuadas para delimitar estratos geográficos de significación epidemiológica que a su vez se solapasen, en la medida de lo posible,

con los límites territoriales provinciales y de las comunidades autónomas.

Posteriormente, los valores de a y b fueron utilizados para calcular el tamaño muestral mínimo n (número mínimo de estaciones permanentes) requerido para estimar el número medio de capturas por trampa (como un índice relativo de abundancia poblacional) de cada uno de los vectores en cada uno de los estratos con un nivel determinado de precisión utilizando la expresión $n = am^{(b-2)} * (t/D)^2$, donde m es la media esperada de *C. imicola* o del complejo *C. obsoletus* capturados por trampa y muestreo, $t = 1,96$ (estimas realizadas con un intervalo de confianza del 95%), y D es el nivel de precisión deseado (error estándar/media) (Southwood y Henderson, 2000). Las estimaciones de n se hicieron para tres niveles de precisión, 0,15, 0,25 y 0,35, ampliamente utilizados para calcular el tamaño muestral en programas de monitorización o de estimas de la distribución de mosquitos u otros insectos (Zhou et al., 2004; Williams et al., 2007) ya que se consideró que implican una variación suficiente como para permitir la detección de cambios con significación biológica o epidemiológica en la abundancia de la especie muestreada. Por ejemplo, un nivel de precisión de 0,25 debería permitir la detección de cambios que supusiesen un aumento al doble o una reducción a la mitad de la abundancia.

Los cálculos de n fueron realizados para cada mes del año, tomando como valores esperados de m el valor mínimo, medio y máximo de las medias de todos los muestreos semanales realizados en un mismo mes a lo largo de todo el periodo de monitorización considerado, excepto cuando $m = 0$, ya que en ese caso no fue posible calcular n . De forma inversa, y a partir de las medias estimadas de todos los muestreos semanales realizados en un mismo mes se calculó el nivel de precisión alcanzado para cada vec-

tor en cada estrato durante el último período del programa de monitorización, desde junio de 2007 hasta julio de 2008.

Resultados

El análisis cluster agrupó las estaciones permanentes con series anuales de datos completas en dos estratos geográficos (estrato norte y estrato sur) claramente diferenciados (figura 1A). El análisis de la varianza mostró que el estrato sur se caracterizó por unas capturas medias de *C. imicola* superiores ($P < 0,01$), unas capturas medias del complejo *C. obsoletus* inferiores ($P < 0,01$) y un CV de *C. imicola* superior ($P < 0,0001$) en comparación al estrato norte, si bien, ambos estratos presentaron un CV de las capturas similar para el complejo *C. obsoletus* ($P > 0,05$) (tabla 1).

Del total de 231 estaciones permanentes de muestreo, 133 fueron adscritas al estrato norte y las restantes 98 al estrato sur (figura 1B). Los límites geográficos aproximados de ambos estratos se solaparon en gran medida con el de las comunidades autónomas, con excepción de Castilla-La Mancha, incluida en el estrato sur salvo las provincias de Guadalajara y gran parte de Cuenca, y sendas estaciones de muestreo localizadas en el sur de Madrid y Ávila respectivamente, adscritas al estrato sur por el análisis cluster debido a las elevadas capturas de *C. imicola*, mientras que ambas provincias fueron adscritas en su mayoría al estrato norte. La delimitación de los límites de ambos clusters entre las provincias de Salamanca y Cáceres, y entre Valencia y Alicante estuvo motivada, principalmente por el criterio de no fragmentar las áreas pertenecientes a una misma comunidad autónoma.

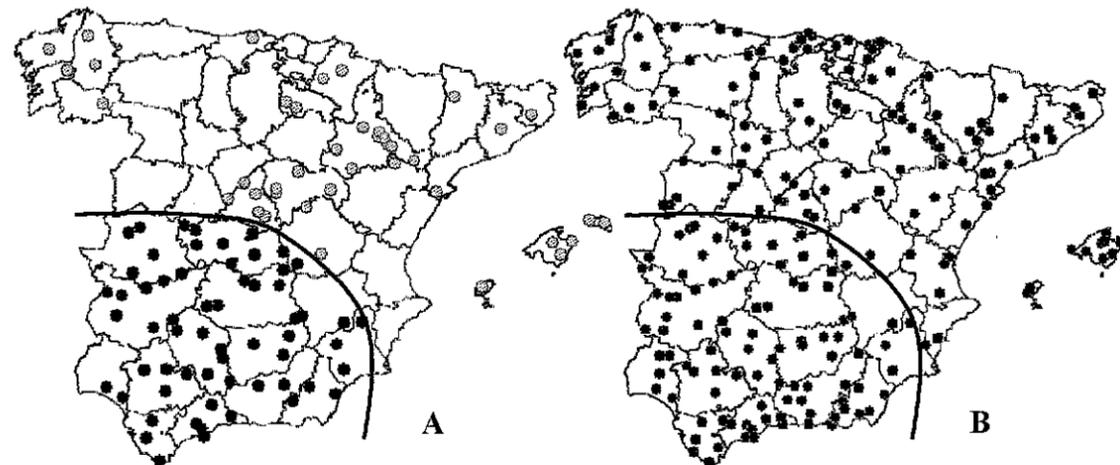


Figura 1. Distribución de las estaciones de muestreo permanente en los dos estratos geográficos. A: segregación mediante análisis cluster de las estaciones permanentes con serie temporal completa de datos igual o superior a un año (gris: estrato norte; negro: estrato sur). B: Asignación del total de estaciones permanentes a ambos estratos. Los límites aproximados de éstos se han delimitado con una línea continua.

Figure 1. Distribution of sampling stations across both geographical strata. A: classification by cluster analysis of sampling stations with complete annual data series (grey dots: north stratum; black dots: south stratum). B: Distribution of the overall sampling stations across both strata. Approximate strata limits have been delimited by a continuous line.

Tabla 1. Media (desviación estándar) y coeficiente de variación CV (desviación estándar) de las capturas de *C. imicola* y del complejo *C. obsoletus* en cada uno de los estratos geográficos
Table 1. Mean (SD) and variation coefficient CV (SD) of captures of *C. imicola* and *C. obsoletus* complex in both geographical strata

	Media <i>C. imicola</i>	Media <i>C. obsoletus</i>	CV <i>C. imicola</i>	CV <i>C. obsoletus</i>
Estrato norte	1,35 (4,54)	17,50 (38,53)	177,32 (222,49)	378,40 (153,70)
Estrato sur	46,12 (90,81)	3,07 (7,95)	320,16 (131,31)	387,69 (186,88)

La variación del número medio de ejemplares capturados por trampa cada mes (figura 2) mostró claramente las diferencias en la dinámica poblacional de ambos vectores. La dinámica poblacional para *C. imicola* o para el complejo de especies *C. obsoletus* fue muy similar en ambos estratos geográficos, con un patrón de variación estacional de las capturas que fue relativamente sincrónico para ambos estratos y la misma especie o grupo de especies. En el caso de *C. imicola*, el período de máximas capturas medias estuvo localizado en los meses de agosto-septiembre, mientras que éstas fueron prácticamente inexistentes de diciembre a abril. En el caso del complejo *C. obsoletus*, el período de máximas capturas estuvo comprendido entre mayo-julio, mientras que el de mínimas se registró entre noviembre y marzo. Sin embargo, a diferencia de lo observado

para *C. imicola*, el complejo *C. obsoletus* fue capturado con relativa frecuencia durante este período de mínimas capturas, especialmente en las estaciones localizadas en el estrato norte. La elevada desviación estándar estimada para cada media mensual en ambos vectores fue debida, no sólo a las variaciones interanuales sino también a la marcada variabilidad en el número de capturas entre los muestreos semanales realizados dentro de un mismo mes y año.

La relación entre la media y la varianza de las capturas de los dos vectores en ambos estratos siguió en gran medida la ley de Taylor, permitiendo unos excelentes ajustes de los modelos de regresión lineal (tabla 2). Los valores de *b* estimados a partir de los cuatro modelos de regresión fueron muy similares entre sí y superiores a 1, indicando una agregación de las poblaciones muy

Tabla 2. Valores estimados para los parámetros *a* y *b* de la ley de Taylor y ajuste de los modelos de regresión lineal

Table 2. Estimated values for *a* and *b* Taylor's power law parameters and coefficient of determination of the linear regression models fitted

	<i>a</i>	<i>b</i>	R^2	<i>P</i>
Estrato norte <i>C. imicola</i>	14,54	1,91	0,99	< 0,0001
Estrato sur <i>C. imicola</i>	19,59	1,89	0,99	< 0,0001
Estrato norte <i>C. obsoletus</i>	10,43	1,97	0,98	< 0,0001
Estrato sur <i>C. obsoletus</i>	22,09	1,95	0,98	< 0,0001

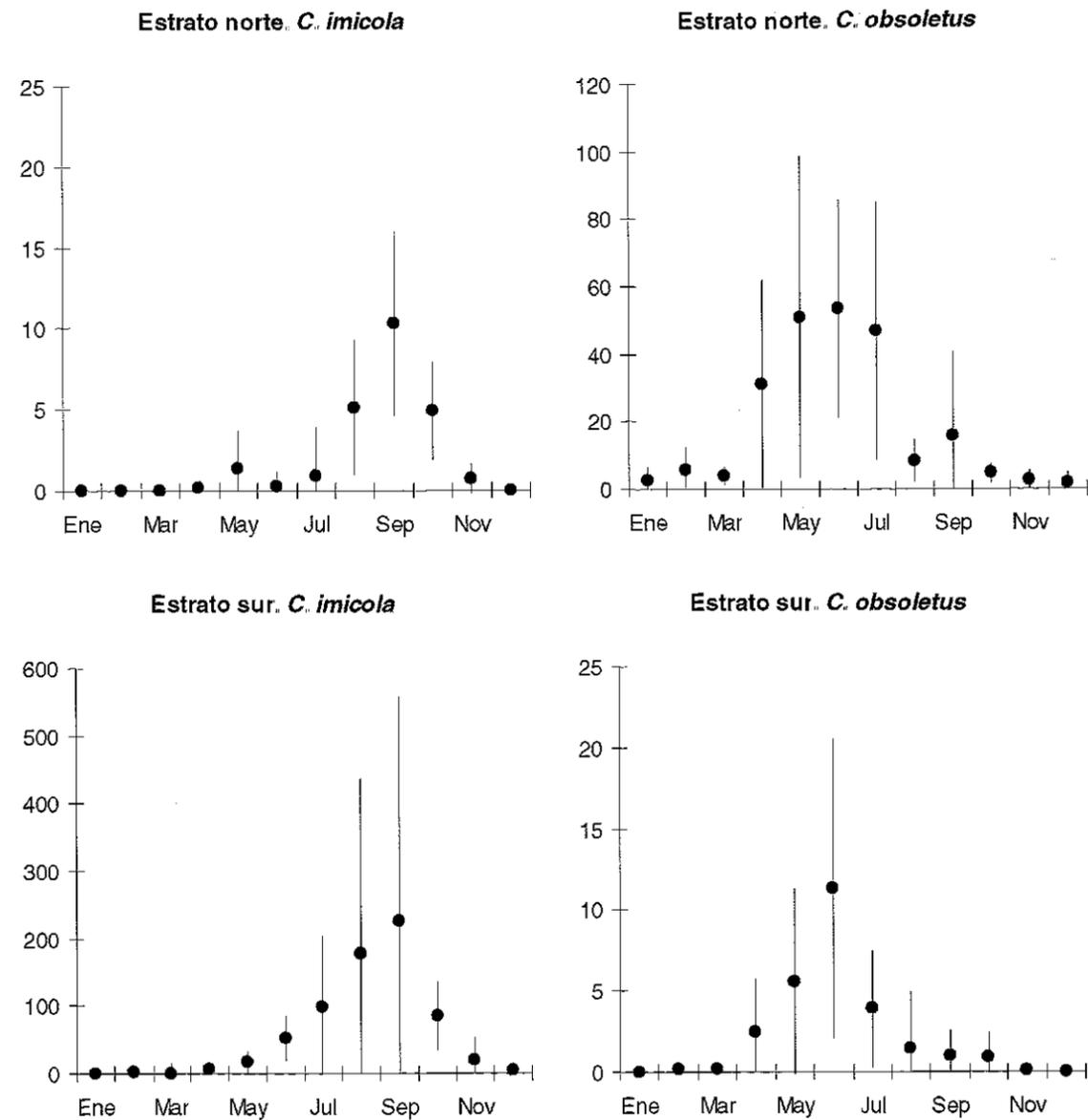


Figura 2. Media y desviación estándar del número de ejemplares de cada vector capturados por trampa y muestreo semanal en cada mes. La media se ha estimado a partir del número medio de ejemplares capturados por trampa en cada muestreo semanal.
 Figure 2. Mean and standard deviation of the number of *C. imicola* and *C. obsoletus* complex caught per trap, weekly sampling and month. The monthly mean has been estimated from the mean number of *Culicoides* caught per trap during each weekly sampling.

similar para ambos vectores en los dos estratos geográficos. De este modo, el número de estaciones requerido para estimar variaciones en el número de ejemplares capturados con los tres niveles de precisión *D* fue relativamente similar para los dos vectores (tablas 3 y 4).

El número requerido de estaciones varió considerablemente a lo largo del año, en consonancia a la variación observada en el número de capturas. Considerando el número de estaciones calculado a partir de los valores medios de capturas mensuales y dividiendo el número máximo por el número

Tabla 3. Número de estaciones permanentes necesario para estimar la abundancia de *C. imicola* en cada uno de los estratos geográficos con tres niveles de precisión *D*. El tamaño muestral se ha calculado sobre la base de una abundancia esperada igual a la abundancia media (mínima/máxima) estimada para cada mes. Cuando la abundancia estimada fue igual a 0, no se calculó el tamaño muestral (-)
 Table 3. Required sample size (number of traps) to estimate *C. imicola* abundance within both geographical strata for three precision levels (*D*). Sample size has been calculated at expected abundances equal to observed monthly mean (minimum/maximum) abundance. When observed abundance was 0, required sample size was not calculated (-)

	Estrato norte			Estrato sur		
	D 0.15	D 0.25	D 0.35	D 0.15	D 0.25	D 0.35
Enero	188 (159/-)	68 (57/-)	35 (29/-)	166 (138/-)	60 (50/-)	31 (25/-)
Febrero	209 (178/-)	75 (64/-)	38 (33/-)	119 (89/-)	43 (32/-)	22 (16/-)
Marzo	188 (163/-)	68 (59/-)	35 (30/-)	126 (106/165)	45 (38/59)	23 (19/30)
Abril	157 (131/-)	57 (47/-)	29 (24/-)	99 (83/186)	36 (30/67)	18 (15/34)
Mayo	130 (108/-)	47 (39/-)	24 (20/-)	90 (79/146)	32 (28/52)	17 (15/27)
Junio	150 (134/-)	54 (48/-)	28 (25/-)	80 (72/88)	29 (26/32)	15 (13/16)
Julio	135 (111/-)	49 (40/-)	25 (20/-)	74 (64/98)	27 (23/35)	14 (12/18)
Agosto	115 (105/145)	42 (38/52)	21 (19/27)	70 (57/86)	25 (20/31)	13 (10/16)
Septiembre	108 (103/130)	39 (37/47)	20 (19/24)	68 (55/88)	24 (20/32)	12 (10/16)
Octubre	116 (107/134)	42 (39/48)	21 (20/25)	75 (71/84)	27 (26/30)	14 (13/16)
Noviembre	137 (121/-)	49 (43/-)	25 (22/-)	88 (73/169)	32 (26/61)	16 (13/31)
Diciembre	186 (158/-)	67 (57/-)	34 (29/-)	104 (83/147)	37 (30/53)	19 (15/27)

Tabla 4. Tamaño muestral (número de estaciones permanentes) necesario para estimar la abundancia del complejo *C. obsoletus* en cada uno de los estratos geográficos con tres niveles de precisión D. El tamaño muestral se ha calculado sobre la base de una abundancia esperada igual a la abundancia media (mínima/máxima) estimada para cada mes. Cuando la abundancia estimada fue igual a 0, no se calculó el tamaño muestral

Table 4. Required sample size (number of traps) to estimate *C. obsoletus* complex abundance within both geographical strata for three precision levels (D). Sample size has been calculated at expected abundances equal to observed monthly mean (minimum/maximum) abundance. When observed abundance was 0, required sample size was not calculated (-)

	Estrato norte			Estrato sur		
	D 0.15	D 0.25	D 0.35	D 0.15	D 0.25	D 0.35
Enero	157 (150/171)	57 (54/61)	29 (27/31)	183 (167/-)	66 (60/-)	34 (31/-)
Febrero	154 (148/166)	55 (53/60)	28 (27/30)	161 (145/-)	58 (52/-)	30 (27/-)
Marzo	155 (152/176)	56 (55/63)	29 (28/32)	159 (153/169)	57 (55/61)	29 (28/31)
Abril	147 (142/159)	53 (51/57)	27 (26/29)	139 (128/179)	50 (46/64)	26 (24/33)
Mayo	145 (141/155)	52 (51/56)	27 (26/28)	134 (124/156)	48 (45/56)	25 (23/29)
Junio	145 (143/153)	52 (51/55)	27 (26/28)	129 (123/151)	46 (44/54)	24 (23/28)
Julio	146 (141/151)	52 (51/55)	27 (26/28)	136 (128/150)	49 (46/54)	25 (23/28)
Agosto	152 (148/162)	55 (53/58)	28 (27/30)	143 (133/167)	51 (48/60)	26 (24/31)
Septiembre	150 (144/157)	54 (52/57)	28 (26/29)	146 (133/174)	52 (48/63)	27 (24/32)
Octubre	154 (152/159)	56 (55/57)	28 (28/29)	147 (133/184)	53 (48/66)	27 (24/34)
Noviembre	157 (152/-)	56 (55/-)	29 (28/-)	165 (152/184)	60 (55/66)	30 (28/34)
Diciembre	159 (151/173)	57 (54/62)	29 (28/32)	174 (159/184)	63 (57/66)	32 (29/34)

ro mínimo mensual de estaciones de muestreo requeridas para cualquiera de los niveles de precisión, en el caso de *C. imicola*, se obtuvo un coeficiente de 2,5 para el estrato sur, mientras que para el estrato norte el coeficiente se redujo a 1,9. En el caso del complejo *C. obsoletus* estos coeficientes fueron inferiores, con un valor de 1,4 en el estrato sur y de 1,1 en el estrato norte. Es

decir, para éste último caso, por ejemplo, haría falta un número similar de estaciones de muestreo tanto en periodos de máximas como de mínimas capturas anuales.

Por otro lado, para cualquiera de los dos vectores en cualquiera de los estratos, el incremento del nivel de precisión de 0,35 a 0,15 implicaría un aumento aproximado de

5,4 veces el número necesario de estaciones de muestreo permanentes en todos los meses del año, mientras que pasar de un nivel de 0,35 a 0,25 implicaría un aumento aproximado de 2. El aumento del nivel de precisión de 0,25 a 0,15, por su parte, requeriría el incremento del número de estaciones por un factor de 2,8.

El número de estaciones funcionales durante el último periodo del programa de monitorización (133 en el estrato norte y 98 en el estrato sur), este número fue superior al requerido en cualquier mes para obtener estimas con un nivel de precisión de 0,25 o inferior. Así, en base a los valores medios de capturas mensuales (figura 2), y a partir de los meses con las medias máxima y mínima de capturas de cada vector en cada estrato, el nivel de precisión alcanzado durante el último periodo del programa de monitorización osciló entre 0,13 y 0,18 o 0,12 y 0,19 en el estrato norte y sur respectivamente para *C. imicola*, mientras que en el caso del complejo *C. obsoletus*, el nivel de precisión fue de 0,16 en el estrato norte y varió entre 0,17 y 0,21 en el estrato sur.

Discusión

El presente trabajo es la primera evaluación realizada a un programa de monitorización de vectores implementado a escala nacional en nuestro país. Los resultados obtenidos han sugerido que el esfuerzo de muestreo aplicado ha sido más que suficiente para detectar cambios en el número de capturas de ambos vectores a niveles de precisión considerados adecuados para este fin y que, posiblemente, con un esfuerzo menor el programa podría seguir manteniendo su eficacia desde el punto de vista epidemiológico.

La división del área monitorizada en diferentes estratos es una práctica frecuente en la opti-

mización del uso de los recursos dedicados al muestreo, pues permite ajustar el esfuerzo de monitorización en función de las características poblacionales de la especie objeto de seguimiento en cada uno de ellos (Southwood y Henderson, 2000). En el presente trabajo el área correspondiente a España peninsular e islas Baleares ha sido dividida en dos estratos diferenciados en base tanto a la dinámica poblacional de los dos vectores como al componente territorial (geográfico y político). Ello ha supuesto que, si bien para *C. imicola*, con un área de distribución muy localizada, ambos estratos representan escenarios biológicos claramente distintos, probablemente esta significación biológica se haya visto parcialmente reducida para el complejo *C. obsoletus* por ser un grupo de varias especies y contar con un área de distribución más extensa que *C. imicola* (Calvete et al., 2008c). Como contrapartida a la posible pérdida de significación biológica, no obstante, la delimitación de ambos estratos teniendo en cuenta aspectos territoriales se ha considerado de utilidad desde el punto de vista de la gestión del programa de monitorización por parte del MARM y de las propias comunidades autónomas.

La evolución de las capturas medias mensuales de ambos vectores observadas a lo largo de un año a escala nacional, fueron plenamente coincidentes con los patrones de variación descritos anteriormente por otros autores a escala local o regional en nuestro país (Ortega et al., 1998; Ortega et al., 1999; Miranda et al., 2004). Este patrón de variación se ha caracterizado por una fuerte estacionalidad de las capturas en ambos vectores, y con un pico máximo de capturas que se alcanza más prematuramente para el complejo *C. obsoletus* que en *C. imicola*. Si se asume que el número medio de capturas es un índice relativo de la abundancia poblacional, el patrón de variación combinado para ambos vectores implica que, en general, el

periodo comprendido entre abril y octubre se podría considerar como el periodo de máxima abundancia de vectores de lengua azul en contraposición al periodo comprendido entre noviembre y marzo, en donde la abundancia de ambos es mínima y que, por lo tanto, el riesgo de transmisión del virus debería ser menor en comparación con el periodo de máxima abundancia. Esta disminución sustancial del riesgo de transmisión, no obstante, si bien es factible asumirla en la práctica para *C. imicola*, no lo sería tanto para el complejo *C. obsoletus*, en el que la existencia de unos niveles de población activa y su aparente implicación en el mantenimiento y transmisión del virus durante este período de mínima abundancia han sido denunciados recientemente (Losson et al., 2007).

La definición de un periodo de baja transmisión del virus de la lengua azul en Europa resulta de gran importancia a nivel epidemiológico y comercial, ya que asegura periodos del año en los que se puede dar movimiento de animales con un bajo riesgo de transmisión del virus, aunque se puedan capturar individuos de cualquiera de las especies de vectores de forma esporádica (Varios Autores, 2008). No obstante, para poder determinar de forma precisa los periodos de riesgo de transmisión será necesario conocer mejor las estrategias de hibernación de las diferentes especies de vectores (Miranda et al., 2008), así como la influencia de la sensibilidad de los sistemas de muestreo utilizados, en este caso las trampas de luz sobre la precisión de las estimas, especialmente en los periodos de bajos niveles poblacionales (Del Río et al., 2008).

Con relación a la precisión de las estimas y al número de estaciones requerido, el excelente ajuste obtenido en los modelos de regresión lineal ha sugerido que la utilización de los datos de estaciones permanentes con series de datos incompletas no ha supuesto

una pérdida significativa de exactitud y precisión a la hora de estimar los parámetros *a* y *b* necesarios para el cálculo del tamaño muestral en base a la ley de Taylor. Los resultados del análisis han evidenciado que con el esfuerzo de muestreo utilizado se han alcanzado, en la estimación de la variación de la abundancia de ambos vectores, unos niveles de precisión a escala nacional que se consideran suficientes para los objetivos de un programa de vigilancia entomológica. Los mismos resultados han sugerido que los objetivos del programa podrían también alcanzarse reduciendo el número de estaciones permanentes a costa de rebajar la precisión de las estimaciones a niveles todavía asumibles en un programa de este tipo. De este modo, considerando el número de estaciones requeridas en cada estrato para los niveles de precisión de 0,25 y 0,35 (tablas 2 y 3), tomando como nivel de estima las capturas medias observadas en cada mes, y teniendo en cuenta el mes para el que se ha calculado el mayor número de estaciones necesarias (independientemente del vector considerado), en el caso del estrato norte, y en contraposición a las 133 estaciones funcionales actuales, podría ser suficiente con disponer de un número comprendido entre 75 y 38 estaciones para obtener estimas a lo largo del año con niveles mínimos de precisión (en los meses de máxima abundancia la precisión se incrementaría) comprendidos entre 0,25 y 0,35 para *C. imicola*. Esta precisión se incrementaría para el complejo *C. obsoletus*, ya que el número de estaciones estimado para éste ha sido inferior, entre 57 y 29 respectivamente para ambos niveles de precisión. En el caso del estrato sur, se tomaría como referencia el número de estaciones calculado para el complejo *C. obsoletus*, de tal manera que las 98 estaciones actuales podrían reducirse a un número comprendido entre 66 y 34 para obtener estimas a niveles de precisión comprendidos entre 0,25 y 0,35 respectivamente. En este caso la

precisión sería superior para *C. imicola*. Teniendo en cuenta el número de provincias que componen cada estrato, para alcanzar los niveles mínimos de precisión comprendidos entre 0,25 y 0,35 el número necesario de estaciones se alcanzaría, aproximadamente, manteniendo entre 1 y 2 estaciones funcionales por provincia en el caso del estrato norte y entre 3 y 5 por provincia en el estrato sur. Esta simple regla implicaría una notable reducción de los recursos, y por lo tanto de los costes, dedicados a la monitorización de las poblaciones de vectores sin comprometer la utilidad de los resultados obtenidos.

Además, e independientemente del nivel de precisión, el estrato considerado y los vectores implicados, mediante este trabajo se ha demostrado que haría falta el doble de estaciones permanentes entre el periodo de máximas capturas y el de mínimas para obtener una estimación adecuada a lo largo del año. Esto permitiría reducir a la mitad el esfuerzo de muestreo durante los periodos de máxima abundancia, así como el tiempo dedicado al procesamiento de muestras e identificación de las especies de vectores, con lo que el programa de vigilancia entomológica a nivel nacional ganaría en eficacia.

Agradecimientos

El desarrollo del programa de monitorización de las poblaciones de *Culicoides* no sería posible sin el esfuerzo de numerosos técnicos, de las Administraciones regionales y de los propietarios de las explotaciones ganaderas en donde se llevan a cabo los muestreos semanales. El programa de monitorización está financiado por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino al que queremos expresar nuestros agradecimientos por los datos facilitados dentro del marco del convenio que mantiene con la

Universidad de Zaragoza. También queremos expresar nuestro agradecimiento a dos evaluadores anónimos por sus sugerencias.

Referencias bibliográficas

- Calvete C, Miranda MA, Estrada R, Borrás D, Sarto V, Collantes F, García de Francisco JM, Moreno N, Lucientes J, 2006. Spatial distribution of *Culicoides imicola*, the main vector of the Bluetongue virus, in Spain. *Vet. Rec.* 158: 130-131.
- Calvete C, Estrada R, Calvo JH, Calavia R, Miranda MA, Borrás D, Mañuz B, Romero L, Lucientes J, 2008a. *Culicoides* species and transmission of bluetongue virus in Spain. *Vet. Rec.* 162: 255.
- Calvete C, Estrada R, Miranda MA, Borrás D, Calvo JH, Lucientes J, 2008b. Ecological correlates of bluetongue virus in Spain: Predicted spatial occurrence and its relationship with the observed abundance of the potential *Culicoides* spp. *Vector. Vet. J.* (en prensa) doi:10.1016/j.tvjl.2008.06.010.
- Calvete C, Estrada R, Miranda MA, Borrás D, Calvo JH, Lucientes J, 2008c. Modelling the distributions and spatial coincidence of the bluetongue vectors *Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus* group throughout the Iberian Peninsula. *Med. Vet. Entomol.* 22: 124-134.
- Del Río R, Monerris M, Miranda MA, Calvete C, Borrás D, Miquel M, Estrada R, Lucientes J, 2008. Traps used in different European countries for the monitoring of vectors of Bluetongue (BT) and African Horse Sickness (AHS). XXIII International Congress of Entomology. Durban. Sudáfrica.
- Du Toit RM, 1944. The transmission of bluetongue and horsesickness by *Culicoides*. *Onderstepoort J. Vet.* 19: 7-16.
- Losson B, Mignon B, Paternostre J, Madder M, De Deken R, De Deken G, Deblauwe I, Fassotte C, Cors R, Defrance T, Delécolle JC, Baldet T, Haurbruge E, Frédéric F, Bortels J, Simonon G, 2007. Biting midges overwintering in Belgium. *Vet. Rec.* 160: 451-452.

- Manso-Ribeiro JJ, Rosa-Azevedo A, Noroña FO, Braco-Forte MC, Grave-Pereira C, Vasco-Fernández M, 1957. Fiebre catarrhale du mouton (Bluetongue). Bull. Off. Int. Epizoot. 48: 350-367.
- Meiswinkel R, Gomulski LM, Delécolle JC, Goffredo M, Gasperi G, 2004. The taxonomy of *Culicoides* vector complexes – unfinished business. Vet. Ital. 40: 151-159.
- Meiswinkel R, Van-Rijn P, Leijts P, Goffredo M, 2007. Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. Vet. Rec. 161: 564-565.
- Mellor PS, Pitzolis G, 1979. Observations on breeding sites and light trap collections of *Culicoides* during an outbreak of bluetongue in Cyprus. Bull. Entomol. Res. 69: 229-234.
- Mellor PS, Boorman JPT, Wilkinson PJ, Martinez-Gomez F, 1983. Potential vectors of bluetongue and African horse sickness viruses in Spain. Vet. Rec. 112: 229-230.
- Mellor PS, Tabachnick W, Baldet T, Baylis M, Bellis G, Calistri P, Delécolle JC, Goffredo M, Meiswinkel R, Mullens B, Scaramozzino P, Torina A, Venter G, White D, 2004. Conclusion of working groups – vectors. Vet. Ital. 40: 715-717.
- Miranda MA, Borrás D, Rincón C, Alemany A, 2003. Presence in the Balearic Islands (Spain) of the midges *Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus* group. Med. Vet. Entomol. 17: 52-54.
- Miranda MA, Rincón C, Borrás D, 2004. Seasonal abundance of *Culicoides imicola* and *C. obsoletus* in the Balearic Islands. Vet. Ital. 40: 292-295.
- Miranda M A, Del Río R, Monerris M, Miquel M, Calvete C, Estrada R, Lucientes J, Borrás D, 2008. Overwintering of *Culicoides* spp. in the western Mediterranean Basin. XXIII International Congress of Entomology. Durban. Sudáfrica.
- Ortega MD, Lloyd JE, Holbrook FR, 1997. Seasonal and geographical distribution of *Culicoides imicola* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) in southwestern Spain. J. Am. Mosquito Contr. 13: 227-232.
- Ortega MD, Mellor RS, Rawlings P, Pro MJ, 1998. The seasonal and geographical distribution of *Culicoides imicola*, *C. pulicaris* group and *C. obsoletus* biting midges in central and southern Spain. Arch. Virol. 14 (Suppl.): 85-91.
- Ortega MD, Holbrook FR, Lloyd JE, 1999. Seasonal distribution and relationship to temperature and precipitation of the most abundant species of *Culicoides* in five provinces of Andalusia, Spain. J. Am. Mosquito Contr. 15: 391-399.
- Purse BV, Mellor PS, Baylis M, McCormick BJJ, Rogers DJ, 2007. Incriminating bluetongue virus vectors with climate envelope models. J. Appl. Ecol. 44: 1231-1242.
- Southwood TRE, Henderson PA, 2000. Ecological methods, 3rd ed. Blackwell, Oxford, United Kingdom.
- Taylor LR, 1961. Aggregation, variance and the mean. Nature 189: 732-735.
- Taylor WP, 1986. The epidemiology of bluetongue. Rev. Sci. Tech. OIE. 5: 351-356.
- Varios autores, 2008. Bluetongue Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (Question No EFSA-Q-2007-201) The EFSA Journal (2008) 735: 36-70. http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902008725.htm
- Williams CR, Long SA, Webb CE, Bitzhenner M, Geier M, Russell RC, Ritchie SA, 2007. *Aedes aegypti* population sampling using BG-sentinel traps in North Queensland Australia: statistical considerations for trap deployment and sampling strategy. J. Med. Entomol. 44: 345-350.
- Zhou G, Minakawa N, Githeko A, Yan G, 2004. Spatial distribution patterns of malaria vectors and sample size determination in spatially heterogeneous environments: a case study in the West Kenyan Highland. J. Med. Entomol. 41: 1001-1009.

(Aceptado para publicación el 9 de diciembre de 2008)