



UNIVERSIDAD
DE
CORDOBA



Departamento de Sanidad Animal

Doctoral Thesis

(International Mention)

Epidemiological study of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in Mediterranean ecosystem in Southern Spain

Tesis Doctoral

(con Mención Internacional)

Estudio epidemiológico de lengua azul y enfermedad hemorrágica epizootica en ecosistemas mediterráneos del sur de España

Antonio José Arenas Montes
Córdoba, 26 de mayo de 2013

TITULO: *Estudio epidemiológico de lengua azul y enfermedad hemorrágica epizootica en ecosistemas mediterráneos del sur de España*

AUTOR: *ANTONIO JOSE ARENAS MONTES*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: Estudio epidemiológico de lengua azul y enfermedad hemorrágica epizootica en ecosistemas mediterráneos del sur de España.

DOCTORANDO: Antonio José Arenas Montes.

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

La tesis doctoral titulada *Estudio epidemiológico de lengua azul y enfermedad hemorrágica epizootica en ecosistemas mediterráneos del sur de España* y que ha realizado el doctorando D. Antonio José Arenas Montes, dio comienzo en el curso académico 2010/2011. Durante este periodo el doctorando ha realizado una estancia de tres meses en el Institute for Animal Health, en Pirbright (Reino Unido), considerado como el centro de referencia a nivel europeo para la lengua azul (LA) y la enfermedad hemorrágica epizootica (EHE).

Los objetivos planteados en el trabajo fueron (1) determinar la prevalencia y distribución espacio-temporal del VLA en las poblaciones de ungulados silvestres en el ecosistema Mediterráneo, así como, establecer los principales factores de riesgo potencialmente implicados en la epidemiología del VLA en estas especies; (2) Evaluar la posible circulación del VEHE en Andalucía; y (3) describir la distribución espacio-temporal y abundancia de las especies de culicoides presentes en Andalucía.

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis doctoral han sido publicados en dos revistas indexadas en el JCR:

- García-Bocanegra I, **Arenas-Montes A**, Lorca-Oro C, Pujols J, González MA, Napp S, Gómez F, Zorrilla I, Miguel ES, Arenas A. 2011a. Role of wild ruminants in the epidemiology of bluetongue virus serotypes 1, 4 and 8 in Spain. *Veterinary Research* 42: 88.
- **Arenas-Montes, A.**, Arenas, A., García-Bocanegra, I., Mertens, P., Batten, C., Nomikou, K. 2013. Serosurveillance of orbiviruses in wild cervids from Spain. *Veterinary Record* 172: 508-509.

Así mismo, la presente tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes comunicaciones en congresos internacionales:

- García-Bocanegra, I., **Arenas Montes, A.**, Lorca Oró, C., Pujols, J., Gonzalez, M.A., Gómez-Guillamón, F., Zorrilla, I., Arenas, A. Bluetongue virus serotypes 1, 4 and 8 in wild ruminants in Spain. OIE Global Conference on Wildlife. Animal Health and Biodiversity-Preparing for the future Paris, France, 23-25 febrero, 2011. PÓSTER.
- **Arenas-Montes, A.**, Borge, C., Carbonero, A., Perea, A., Gonzalez, M., Cadenas, R., Zorrilla, I., Arenas, A., García-Bocanegra, I. 2010. Maintenance du sérotype 1 du virus de la fièvre catarrhale ovine chez les ruminants sauvages dans le sud de l'Espagne. 28^{ème} Rencontre de la GEEFSM, Rocchetta Nervina, 10–13 de Junio, Italia, 2010. COMUNICACIÓN ORAL.
- **Arenas-Montes, A.**, Arenas, A., González, MA, Pérez, JJ., Lorca-Oró, C., Perea, A., Carbonero, A., Borge, C., Gómez, F., Zorrilla, I., Garcia-Bocanegra, I. 2011. Bluetongue virus seortypes 1, 4 and 8 in wild ruminants from Southern Spain. 4th Congress of European Microbiologist, FEMS 2011. Geneva, Suiza, 26-30 jun, 2011. PÓSTER.
- **Arenas Montes, A.J.** Estudio seroepidemiológico de la Lengua azul y la Enfermedad hemorrágica epizoótica en cérvidos silvestres en Andalucía. 2013. II Congreso científico de investigadores en formación en Agroalimentación de la CeIA3. Córdoba, España 9 -10 de Abril de 2013. COMUNICACIÓN ORAL.

Una vez redactada, la presente tesis ha sido revisada, reuniendo a nuestro juicio todos los requisitos necesarios para su lectura y defensa.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, se expide el presente Informe en Córdoba a veinticuatro de mayo de dos mil trece.

Fdo: Antonio Arenas Casas

Fdo: Ignacio García Bocanegra

ÍNDICE

Summary/Resumen	2
1. Preámbulo	10
2. Revisión bibliográfica	22
2.1. Lengua azul	23
2.2. Enfermedad hemorrágica epizootica	31
2.3. Etiología de los <i>Orbivirus</i>	31
2.4. Epidemiología	37
2.5. Patogénesis	61
2.6. Clínica y lesiones	65
2.6. 1. Clínica y lesiones de la lengua azul	65
2.6.2. Clínica y lesiones de la EHE	71
2.7. Diagnóstico	74
2.8. Medidas de lucha	83
3. Objectives/Objetivos	88
4. Material y métodos	92
4.1. Diseño del estudio	92
4.1.1. Determinación del tamaño de la muestra	92
4.2. Obtención de muestras análisis laboratoriales	95
4.2.1. Muestras de suero	97
4.2.2. Muestras de tejido	97
4.3. Información epidemiológica	98
4.3.1. Variables generales	99
4.3.2. Variables individuales	100
4.3.3. Variables relacionadas con el hábitat	101
4.3.4. Variables relativas al vector	102
4.4. Datos entomológicos	102
4.5. Uso de los SIG	104
4.6. Análisis laboratoriales	105
4.6.1. Técnicas ELISA detección de anticuerpos	105
4.6.1.1. ELISA VLA	106
4.6.1.2. ELISA VEHE	109
4.6.2. Seroneutralización vírica del VLA	112

4.6.3. Técnicas de detección molecular	114
4.6.3.1. Extracción de ARN	114
4.6.3.2. rRT-PCR genérica VLA	116
4.6.3.3. rRT-PCR específica de serotipo VLA	119
4.6.4. Aislamiento del virus	121
4.7. Métodos y análisis estadísticos	123
4.7.1. Tratamiento variables estudios serológicos	123
4.7.1.1. Definición de variables	123
4.7.1.2. Categorización de variables numéricas	124
4.7.1.3. Eliminación de variables	125
4.7.1.4. Codificación de variables	125
4.7.2. Tratamiento de datos entomológico	126
4.7.2.1. Estimadores del estudio descriptivo	126
4.7.2.2. Cálculo variables relativas a culicoides	127
4.7.3. Estudios estadísticos realizados	129
4.7.3.1. Análisis descriptivo univariante	129
4.7.3.2. Análisis descriptivo bivariante	130
4.7.3.3. Análisis de correlaciones múltiples	130
4.7.3.4. Análisis de regresión multivariante	131
4.7.3.4. Elaboración del árbol de decisión CHAID	132
5. Resultados y discusión	134
5.1. Estudios serológicos	134
5.1.1. Estudio de seroprevalencia del VLA	134
5.1.2. Estudio de seroprevalencia del VEHE	141
5.2. Estudio de los factores de riesgo del VLA	145
5.2.1. Análisis descriptivo y bivariante	145
5.2.2. Análisis de correlaciones múltiples	173
5.2.3. Análisis multivariante	174
5.2.4. Árbol de decisión CHAID	182
5.2.5. Plan de lucha	184
5.3. Detección de ARN y aislamiento del VLA	186
5.4. Estudio de abundancia y distribución de <i>Culicoides</i>	193
6. Conclusions /Conclusiones	206
7. Bibliografía	212

AGRADECIMIENTOS

A Nacho, como director de la tesis, por su ayuda constante, por no tener horarios cuando la tesis lo requería, y sobre todo por su predisposición y paciencia para enseñarme a trabajar en el mundo de la investigación.

A Alfonso Carbonero que, aparte de cederme un lugar en su despacho, ha ejercido como si de otro director se tratase cuando lo he necesitado. A Anselmo y a Carmen porque siempre me han ayudado en cualquier cosa que he necesitado. A Alicia Torralbo, Alfonso Lara y Jorge Paniagua por su apoyo y la simpatía que han demostrado conmigo durante este periodo. A José Daniel, José Carlos, Estefanía y Rodrigo por su ayuda cuando hizo falta.

A la Universidad de Córdoba, y especialmente a la Facultad de Veterinaria por proveerme de toda mi formación académica hasta la actualidad.

A Juan Antonio Jaén, Jefe de Servicio Sanidad Animal de la Consejería Agricultura, Pesca y Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, por su colaboración para la obtención de algunas muestras de silvestres y de los datos relativos a culicoides.

Al CReSA, y particularmente a Cristina Lorca por su ayuda y colaboración con las seroneutralizaciones.

A Peter Mertens, Director del Programa de enfermedades transmitidas por vectores en el Institute for Animal Health en Pirbright, por su amabilidad y disposición para realizar el estudio serológico de Enfermedad hemorrágica epizootica. A Kiryaki Nomikou, supervisora de las estancias. A los compañeros de Pirbright, especialmente a Marc Guimerá y Josie Golding por facilitarme la adaptación durante los meses de estancias.

Al departamento de Sanidad Animal de la Universidad Complutense de Madrid y especialmente a Isabel Simarro por su amabilidad durante mis estancias allí.

A Falele, Fernando, Graci, Gregorio, José, Nacho, Paco, Pedro, Rafael Pablo, Ricardo y Rodo porque, a pesar de conocerme desde la época del colegio, siguen teniendo ganas de aguantarme.

A todos *Los Manis* por su ayuda desde que comenzamos la carrera de veterinaria, por su espíritu de grupo y por su inventiva, que es continua.

A mis familiares, especialmente a mis abuelos que con su forma de ser y de afrontar adversidades han sido un ejemplo para todos sus hijos y también para su nieto.

A mi hermana María que es un ejemplo de constancia, de carácter y de humanidad. A mi hermano Javi por su permanente buen humor, por su alegría y por su bondad.

A mi madre Charo, por educarme, por su generosidad, por su sacrificio, por estar pendiente siempre de su familia y por cuidarnos a todos. Muchas gracias.

Sobre todas estas personas, esta tesis doctoral la he podido realizar gracias a mi padre y director, Antonio, que aparte de ser junto a mi madre un ejemplo, ha puesto mucho empeño en ayudarme a mejorar tanto profesional como personalmente, me ha prestado su confianza y me ha transmitido la importancia de responsabilizarme sobre mi trabajo.

Muchas gracias a todos los que están y también a los que lo merecen de alguna u otra forma.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS.

ARN: Ácido Ribonucleico

BHKC: Baby Hamster Kidney cells (línea celular de riñón de hámster)

BOE: Boletín Oficial del Estado

BOJA: Boletín Oficial de la Junta de Andalucía

C: *Culicoides* (género)

c/t: culicoides por trampa

c/tp: culicoides por trampa positiva

CAPMA: Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente. Junta de Andalucía

C-ELISA: ELISA de competición (Competitive ELISA)

CRSA: Centre de Recerca en Sanitat Animal

CT: Ciclo de amplificación

CHAID: Detección automática de interacción mediante Chi-cuadrado (CHI-squared Automatic Interaction Detection)

DC: Densidad de culicoides

DCTP: Densidad de culicoides por trampa positiva

dpi: días post infección

EDO: Enfermedad de declaración obligatoria

EFSA: European Food Safety Authority

EHE: Enfermedad hemorrágica epizootica del ciervo

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent assay

EMEM: Medio Esencial Mínimo de Eagle

Has: Hectáreas

IAH-P: Institute for Animal Health, Pirbright, UK

KC: Línea celular de intestino de *Culicoides variipennis*

LA: Lengua azul

MAGRAMA: Ministerio de agricultura, pesca y medio ambiente

ml: Mililitros

mm: milímetro

NS: Proteína No Estructural (Non Structural)

OIE: Organización Mundial de la Sanidad Animal

PBS: solución tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline)

pC-: Promedio de los controles negativos

PC: Punto de corte

PCR: Polimerase Chain Reaction

pC+: Promedio de los controles positivos

PTP: Porcentaje de trampeos positivos
RASVE: Red de Alerta Sanitaria Veterinaria de España
rRT-PCR: RT-PCR a tiempo real (Real Time RT-PCR)
RT: Recuento Total en el estudio entomológico
RT-PCR: Reverse Transcription-PCR
SEG: Segmento del genoma de los *Orbivirus*
SIG: Sistemas de Información Geográfica
SNV: Sero neutralización vírica
TM: Toneladas
UCO: Universidad de Córdoba
VEE: Virus de la encefalosis equina
VEHE: Virus de la EHE
VEHE-1: Serotipo 1 del VEHE
VEHE-2: Serotipo 2 del VEHE
VEHE-6: Serotipo 6 del VEHE
VEHE-7: Serotipo 7 del VEHE
VLA: Virus de la lengua azul
VLA-1: Serotipo 1 del VLA
VLA-2: Serotipo 2 del VLA
VLA-4: Serotipo 4 del VLA
VLA-6: Serotipo 6 del VLA
VLA-8: Serotipo 8 del VLA
VLA-9: Serotipo 9 del VLA
VLA-10: Serotipo 10 del VLA
VLA-16: Serotipo 16 del VLA
VLA-17: Serotipo 17 del VLA
VLA-25: Serotipo 25 del VLA
VLA-26: Serotipo 26 del VLA
VP: Proteínas virales
VPEA: Virus de la peste equina africana
VWN: Virus de West Nile
 χ^2 : Chi-cuadrado de Pearson

Summary

Bluetongue (BT) and epizootic hemorrhagic disease (EHD) are two emerging and re-emerging notifiable diseases caused by viruses belonging to the genus Orbivirus. Both viruses usually infect domestic and wild ruminants, being *Culicoides* midges the main competent vectors involved in the transmission of these diseases. Among the different species of culicoides, *Culicoides imicola* is considered the main species implicated in the transmission of both orbiviruses in the Mediterranean Basin. During the last decade, the BTV circulation has been very intense in Europe, especially in Spain, where three different serotypes has been detected (1, 4 and 8). However, EHDV circulation has not been detected in Europe to date, although the presence of this virus in northern Africa is a risk for the introduction to European countries.

The main objectives for this thesis were: (1) to determine the spatio-temporal distribution of BTV prevalence in wild ungulate populations in Mediterranean ecosystems from southern Spain, as well to establish the main risk factors potentially involved in the epidemiology of BTV in these species; (2) to evaluate the possible EHDV circulation in Andalusia: and (3) to describe the spatio-temporal distribution and abundance of culicoides species in Andalusia.

The study was carried out in Andalusia during the

period 2006-2012. A total of 2,575 sera and 1,466 tissue samples were obtained from different species of wild ruminants, including 1,227 red deer (*Cervus elaphus*), 296 fallow deer (*Dama dama*), 150 roe deer (*Capreolus capreolus*), 132 mouflon (*Ovis aries mussimon*) and 770 Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*). In addition, to the epidemiological data associated to the sampled individuals, management measures and environmental conditions, data related to the presence and distribution of culicoides species in each sampled area was recorded. Furthermore, to determine the spatio-temporal distribution of culicoides species in Andalusia, an entomological survey was conducted using 45 trapping points homogeneously distributed throughout the region.

BTV seroprevalence was determined using a commercial double-antigen enzyme linked assay (ELISA) and seroneutralisation test (SNT) against the three serotypes detected in Spain. The BTV seroprevalence in wild ruminant population analyzed was 21.9 percent (495/2264), confirming the exposure for the three serotypes circulating in these species. Likewise, the presence of BTV RNA (1.5%; 22/1466) in deer, Spanish ibex and mouflon, and the detection of positive individuals in areas where the virus was not detected in livestock, indicates that wild ruminant species could be playing a relevant role in the maintenance and circulation of BTV in the Mediterranean ecosystem. The

main risk factors potentially associated with the BT infection in wild ruminants in Andalusia were: species (red deer and fallow deer), densities of wild ruminants (medium-high), age (adults), abundance of *C. imicola* (medium-high) and presence of waterholes. The absence of antibodies against EHDV in the 798 sera from the wild cervids analyzed, suggests no virus circulation in the area during the study period.

The descriptive study on culicoides in Andalusia showed that the species with highest values of abundance, wide distribution and presence was *C. imicola*. Other species such as *C. nubeculosus*, *C. pulicaris* and *obsoletus* species Complex, were also frequently detected in Andalusia but their values of abundance, distribution and density were generally less homogeneous.

Resumen

La lengua azul (LA) y la enfermedad hemorrágica epizootica (EHE), son dos enfermedades emergentes y re-emergentes de declaración obligatoria, causadas por virus pertenecientes al género *Orbivirus*. Ambas virosis infectan generalmente a rumiantes domésticos y silvestres, siendo los mosquitos del género *Culicoides*, los vectores principalmente implicados en la transmisión de estas enfermedades, particularmente *C. imicola*, considerado como el principal vector competente en la cuenca mediterránea. En los últimos años, la circulación del virus de la LA (VLA) ha sido muy intensa en Europa, especialmente en España, donde se ha detectado circulación de tres serotipos diferentes (1, 4 y 8). Por el contrario, la circulación del virus de la EHE (VEHE) no ha sido confirmada en Europa hasta la fecha, si bien, la presencia del virus en países norteafricanos determinan un riesgo evidente de entrada en el continente europeo.

Los principales objetivos de este trabajo han sido: 1) determinar la prevalencia y distribución espacio-temporal del VLA en las poblaciones de ungulados silvestres en los ecosistemas mediterráneos, así como, establecer los principales factores de riesgo potencialmente implicados en la epidemiología del VLA en estas especies; 2) Evaluar la posible circulación del VEHE en Andalucía; y 3) describir la

distribución espacio-temporal y abundancia de las especies de culicoides presentes en Andalucía.

El estudio fue llevado a cabo en Andalucía durante el periodo 2006-2012. Se obtuvieron un total de 2.575 muestras de suero y 1.466 de tejidos, procedentes de diferentes especies de rumiantes silvestres, incluyendo 1.227 ciervos (*Cervus elaphus*), 296 gamos (*Dama dama*), 150 corzos (*Capreolus capreolus*), 132 muflones (*Ovis aries mussimon*) y 770 cabras monteses (*Capra pyrenaica hispanica*). Paralelamente a la toma de muestras, se obtuvieron datos epidemiológicos en las diferentes zonas muestreadas relacionados con los animales muestreados, las medidas de gestión y las condiciones ambientales, así como datos de presencia y distribución de especies de culicoides presentes en cada una de estas áreas. Además, para determinar su distribución espacio-temporal, se llevó a cabo un estudio entomológico en 45 puntos de trapeo distribuidos homogéneamente por toda Andalucía.

A partir de los resultados obtenidos, empleando un análisis inmunoenzimático de doble reconocimiento (ELISA) y el test de seroneutralización (SNT) frente a los tres serotipos detectados en España, se determinó una seroprevalencia frente al VLA del 21,9% (495/2264) en la población de rumiantes silvestres analizada, confirmándose la exposición de los tres serotipos circulantes de estas especies. Así mismo, la presencia de ARN vírico (1,5%; 22/1466) del VLA

en ciervo, cabra montés y muflón, junto con la detección de individuos positivos en zonas donde el virus no había sido detectado, indica que estas especies pueden estar jugando un papel importante en el mantenimiento y la circulación del VLA en los ecosistemas mediterráneos. Además, los principales factores de riesgo potencialmente asociados con la LA en ungulados silvestres en Andalucía fueron: la especie (ciervo y gamo), densidad de rumiantes silvestres (media-alta), edad (adultos), abundancia de *C. imicola* (media-alta) y presencia de aguas estancadas. No se han detectado anticuerpos frente al VEHE en los 798 sueros de cérvidos silvestres analizados, lo que sugiere la ausencia de circulación del virus en la zona y periodo de estudio.

El estudio descriptivo de culicoides en Andalucía mostró que la especie con una mayor abundancia, distribución y presencia fue *C. imicola*. Otras especies como *C. nubeculosus*, *C. pulicaris* y las especies del complejo *obsoletus*, fueron igualmente detectadas en Andalucía presentando menores valores de abundancia y densidad, así como distribuciones generalmente menos homogéneas.

1. Preámbulo

Tradicionalmente, la ganadería ha representado uno de los principales recursos en los ecosistemas mediterráneos. Particularmente en Andalucía se han seleccionado a lo largo de los siglos numerosas razas de aves, equinos, porcinos y rumiantes. Precisamente son las diferentes especies de rumiantes domésticos presentes en Andalucía (bovinos, ovinos y caprinos), las más ampliamente distribuidos por toda la región, dadas sus aptitudes productivas para la lana, la leche o la carne (Boza López, 2007; Buxadé Carbó, 2007). Las razas seleccionadas en el sur de España han estado asociadas a modelos de explotación extensivo, consecuencia del clima suave, de su adaptación y resistencia a la escasez de alimento durante los meses estivales (García Romero y Cordero Morales, 2006).

La importancia de los rumiantes domésticos en Andalucía queda reflejada en la amplitud de sus censos, siendo el ganado ovino (*Ovis aries*) con 2.670.810 cabezas el más abundante en esta región. El ganado caprino (*Capra hircus*), con un censo de 1.072.458 animales, representa la segunda especie en abundancia, seguida del bovino (*Bos taurus*) con 605.105 cabezas. Sin embargo, si tenemos en cuenta la producción, el ganado bovino es el que genera una mayor cantidad de carne (30.118 TM) y leche (casi medio millón de TM). El ovino presenta producciones de 5.619 TM de carne, 2.700 TM de leche y 3.407 TM de lana, mientras

que el ganado caprino produce 1.725 TM de carne y 230 mil TM de leche (CAPMA, 2012).

La distribución de censos y producciones de rumiantes en Andalucía está muy diversificada, existiendo especies adaptadas a zonas concretas. El bovino de leche es explotado en intensivo y presenta dos importantes núcleos de producción en el Valle de los Pedroches y Vega de Granada. La producción de ganado bovino de carne y el ovino se explotan de forma mayoritaria en extensivo aprovechando los pastos de las zonas adeshadas de Sierra Morena y la Sierra de Cádiz. El caprino se localiza generalmente en zonas de las sierras de Granada, Málaga y Sierra Morena (Martín Bellido y cols., 2001; Boza López, 2007; Buxadé Carbó, 2007).

Pero si importante resulta el aprovechamiento del ganado doméstico en la zona sur de España, no lo es menos la explotación de las especies cinegéticas, constituyendo en algunas zonas rurales una de las fuentes de ingresos más importantes para sus habitantes (Carranza Almansa, 2002; Anónimo, 2007a). El éxito del aprovechamiento cinegético en los últimos años se hace evidente con los datos de censos y animales abatidos en cacerías que muestran que las poblaciones de ungulados silvestres se encuentran en clara expansión (Acevedo y cols., 2008; CAPMA, 2012; MAGRAMA, 2012).

Existen diferentes especies de rumiantes silvestres en

Andalucía como el ciervo (*Cervus elaphus*), el corzo (*Capreolus capreolus*) o la cabra montés (*Capra pyrenaica*), que presentan ecotipos autóctonos y por tanto una gran importancia desde el punto de vista biológico y de conservación (Arenas y Perea, 1993; San José, 1997; Granados y cols., 2001). Otras como el muflón (*Ovis aries musimon*) y el gamo (*Dama dama*), introducidas, pero muy bien adaptadas, se encuentran también ampliamente distribuidas por la geografía andaluza (Braza, 2004; Santiago Moreno, 2004).

El ciervo presenta una elevada adaptación a los ecosistemas del sur de la Península Ibérica, pudiendo encontrar densidades medias inusualmente elevadas (de entre 5,75 y 21,81 animales/Km²) en algunos lugares de Sierra Morena, Sierra de Cádiz, los Alcornocales y el Andévalo (CAPMA, 2013).

La moderna especialización en el manejo del ciervo, ha tenido como consecuencia el aumento de sus poblaciones (Acevedo y cols. 2008); parte de este incremento está relacionado con la existencia de cercas cinegéticas que permiten adaptar la carga poblacional a la productividad de la zona cercada e incluso suplementar con alimento, acarreando un incremento de la densidad (Arenas y Perea, 1993; García y cols., 1999; Acevedo y cols., 2008). Otro hecho que constata este aumento poblacional es la cantidad de ciervos abatidos anualmente, que ha venido

sobrepasando los 50.000 ejemplares en los últimos años sólo en Andalucía, suponiendo más del 43 por ciento del total nacional (MAGRAMA, 2011; CAPMA, 2011; FAC, 2012).

El corzo presenta menores densidades que el ciervo (menos de 5 individuos/Km²), distribuyéndose por la Sierra de Cádiz, los Alcornocales y la serranía de Ronda (corzo morisco) y algunas poblaciones aisladas al norte de Sierra Morena (San José, 1997; CAPMA, 2013). La propia etología de esta especie, lo hacen muy territorial, tendiendo a formar pequeños grupos o incluso presentándose frecuentemente animales solitarios. Aunque su manejo en zonas proclives no es complicado, su expansión a otros lugares resulta más lenta en comparación con el resto de cérvidos (Mateos Quesada, 2005).

El gamo es otra de las especies ampliamente distribuida en Andalucía; aunque originario de Asia, fue introducido hace más de dos mil años con fines ornamentales y cinegéticos en muchos lugares de Europa, por lo que se le considera perfectamente adaptado a estos ecosistemas (Braza, 2003). Su carácter dominante sobre otros cérvidos, sus altas tasas de reproducción y el interés cinegético que ha despertado en los últimos años, hacen que sus poblaciones se estén expandiendo por el sur de España. En la actualidad, las densidades de gamo en Andalucía se encuentran en torno a los 6 individuos/Km², en las zonas libres, encontrándose poblaciones estables en Cazorla, Sierra

de Cádiz y Los Alcornocales y en núcleos dispersos distribuidos por Sierra Morena (Braza, 2003; CAPMA, 2013).

En cuanto a la cabra montés, aunque hasta hace poco estaba considerada como especie vulnerable por la IUCN, sus poblaciones se han ido incrementando considerablemente desde mediados del siglo pasado, hasta alcanzar el estatus de especie de preocupación menor, según la misma organización. Existen núcleos importantes en la Sierra de Cádiz, Sierra de Cortes de la Frontera, Serranía de Ronda, Sierra de Tejeda, Almirajara y Alhama, Sierra Nevada y adyacentes y la Sierra de Cazorla. El manejo de la especie resulta a menudo complicado ya que suelen encontrarse en zonas escarpadas y de difícil acceso (Salas de la Vega, 2005). Por este motivo sus densidades son muy variables, oscilando entre los 0,64 y los 8,79 animales/Km² (CAPMA, 2013).

El muflón presenta una elevada cercanía filogenética con la oveja doméstica, siendo considerado por algunos autores como la misma especie. Tras extinguirse hace unos siglos, este óvido fue reintroducido con fines cinegéticos a mediados del siglo XX en España, con ejemplares provenientes de la isla mediterránea de Córcega. La adecuada aclimatación de esta especie a las zonas suroccidentales de la península unido a su elevada prolificidad hacen de ella una especie en clara expansión. Las densidades medias en zonas libres se sitúan en torno a los 4 ejemplares/Km², distribuyéndose en zonas como la Sierra de

Cazorla, la Sierra de Cádiz y los Alcornocales y Sierra Morena, donde se encuentra en núcleos dispersos (Santiago-Moreno y cols., 2004; CAPMA, 2013).

Tanto la actividad ganadera como la cinegética constituyen notables fuentes de ingresos en numerosas áreas rurales de Andalucía, ayudando a mantener la población en zonas tradicionalmente agrestes y deprimidas económicamente (UE, 2012; Carranza Almansa, 2002). Una buena gestión de los animales de renta, de la fauna y del medio que estos habitan, garantizará la conservación y la viabilidad económica de estas zonas.

Dentro de los planes de gestión de la fauna cobra especial importancia la sanidad. En el presente escenario económico y social, el aumento de la población que se ha venido produciendo a nivel mundial ha traído aparejado un incremento de las producciones y del movimiento de los animales; como consecuencia, cada vez es más frecuente la selección genética en las especies de abasto y la intensificación de su proceso de producción para la obtención de un mayor rendimiento. Pero no solo se ha aumentado el número de individuos en el ganado doméstico, también las densidades de muchas las especies silvestres se han incrementado cuantiosamente. Por estos motivos algunas patologías se han visto potenciadas en los últimos años, expandiéndose geográficamente, e incluso incrementando su rango de hospedadores susceptibles

llegando a afectar muchas de ellas al propio ser humano (Anónimo, 2007).

En este sentido, la sanidad de los animales y su relación con la especie humana ha cobrado una especial relevancia, actuando en muchas ocasiones como una barrera económica (OIE, 2009a). Se hacen necesarios, por tanto, organismos supranacionales e independientes que se encarguen de controlar todo lo relacionado con la sanidad animal a nivel global. Con este propósito se creó la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE) en el año 1924 (OIE, 2013), cuyas indicaciones relacionadas con la salud animal y humana son reconocidas por la Organización Mundial del Comercio y por tanto seguidas por la mayoría de los países (OIE, 2009a; OIE, 2013). Para llevar a cabo este cometido la OIE se encarga de emitir directrices relativas al control de las enfermedades en la fauna, al comercio de animales y de sus productos y a la interacción que estos tienen con el ser humano. En los últimos años la OIE ha desarrollado el concepto “One health” que ha adquirido notable relevancia debido a que ofrece una visión integrada de la salud humana, la animal y la del medio (OIE, 2013b).

Resulta, por tanto, fácil el deducir los perjuicios que la presencia de determinadas epizootias pueden ocasionar, afectando principalmente a la salud pública, la economía e incluso ocasionando pérdidas de tipo ecológico asociadas a la mortalidad que algunas enfermedades pueden provocar

en especies y razas amenazadas (Gortázar y cols., 2008).

En el ámbito de la salud pública han sido muchas las zoonosis de diversa etiología que han afectado a las poblaciones humanas en los últimos años (Romero y cols., 1999). En este sentido, Woolhouse y Gowtage-Sequeria (2005) estiman que alrededor de un 60 por ciento de las enfermedades que afectan al ser humano presentan un origen común en los animales. Entre las fuentes de contagio se encuentran; el contacto directo con el animal, el contagio mediante secreciones o heces o subproductos de animales infectados, el contagio por consumo de alimentos de animales portadores del agente, así como el contagio indirecto por vectores. Esta diversidad de fuentes de contagio ponen en evidencia la necesidad de ejercer un control sobre la salud de los animales.

Pero si importante resulta el impacto de las enfermedades en materia de salud pública, sus implicaciones económicas también deben ser consideradas. En este aspecto, las pérdidas pueden estar asociadas a las restricciones comerciales en el movimiento de animales y sus productos, con el coste de las medidas implementadas para su erradicación, así como a las pérdidas productivas y mortalidad de animales ocasionadas en el ganado (OIE, 2012a).

Estas implicaciones económicas, derivadas fundamentalmente de las medidas de erradicación, se hacen

más patentes cuando en el ciclo epidemiológico entran las especies salvajes dada la dificultad para el acceso y manejo de estos animales (Caron y cols., 2013; Arenas-Montes y cols., 2013).

En este sentido, la importancia de la fauna como reservorio de las enfermedades compartidas con el ganado doméstico ha sido sugerida por varios autores (García-Bocanegra y cols., 2011a). Diversas epizootias de este tipo, muchas de ellas consideradas como zoonosis, han emergido o re-emergido en los últimas décadas en Europa (Schmidt y cols., 2013).

Estas enfermedades de ciclo epidemiológico compartido entre la fauna doméstica y la salvaje, han afectado particularmente al sur de la Península Ibérica, notificándose la presencia de algunas como la sarna sarcóptica, enfermedad de Aujeszky, brucelosis o tuberculosis (Arenas y cols., 2002; Gortázar y cols., 2011; García-Bocanegra y cols., 2012). Todas ellas son frecuentemente asociadas al contacto directo entre individuos, propiciado por las elevadas densidades de animales silvestres y al modelo de explotación en extensivo del ganado existentes en esta zona (Gortázar y cols., 2006; Acevedo y cols., 2008).

Del mismo modo, las enfermedades víricas transmitidas de manera indirecta mediante vectores, también conocidas como arbovirosis, han experimentado un fuerte ascenso (Jiménez-Clavero y cols., 2012). En este

sentido la enfermedad de West Nile, que presenta un reservorio silvestre en aves de vida libre, fue detectada en Andalucía afectando a équidos y humanos durante el año 2010 (García-Bocanegra y cols., 2011b). Coincidiendo en el tiempo, la enfermedad provocada por el virus Bagaza ha diezmando las poblaciones de perdices (*Alectoris rufa*) en la zona sur de Andalucía (García-Bocanegra y cols., 2013).

Pero sin lugar a dudas, ha sido la lengua azul (LA) la arbovirosis que ha cobrado una mayor repercusión en la última década, detectándose la circulación de hasta tres serotipos diferentes del virus en España (García-Bocanegra y cols., 2008). La enfermedad afecta principalmente a especies de rumiantes y camélidos, incidiendo particularmente sobre el ganado ovino (OIE, 2009b). Igualmente, las especies de rumiantes salvajes se han visto afectadas por esta enfermedad, notificándose pérdidas puntuales en algunas poblaciones de muflón (Fernández-Pacheco y cols., 2008; Rodríguez-Sánchez y cols., 2010). Aunque el conocimiento del ciclo del VLA en estos animales es aún muy limitado, algunas investigaciones sugieren una notable implicación de los rumiantes salvajes en la epidemiología de la enfermedad, actuando éstos como reservorios (Falconi y cols., 2011; García-Bocanegra y cols., 2011). Por tanto, se hacen necesarios estudios acerca de la epidemiología del virus en su relación con las especies salvajes con objeto de diseñar programas que permitan actuar de manera efectiva en el

control y erradicación de esta enfermedad.

Por otro lado, la enfermedad hemorrágica epizootica (EHE), también transmitida por vectores, es provocada por un virus muy cercano filogenéticamente al de la LA y afecta principalmente a los rumiantes (OIE, 2009b). Esta arbovirosis se describió por primera vez en el ciervo de cola blanca de Norteamérica, especie en la que este virus suele causar grandes mortalidades (Stallknecht y Howerth, 2004). En los últimos años la enfermedad ha sido detectada en diferentes países del norte de África, afectando fundamentalmente al ganado bovino (Madani y cols., 2011). La reciente circulación de este virus en Marruecos y Argelia entre 2004 y 2008, supone un riesgo evidente de que el agente pueda entrar o incluso haya penetrado en Europa por el sur de la península Ibérica (EFSA, 2009). Sin embargo, no existen estudios realizados que descarten la circulación de la EHE durante el periodo en que la enfermedad fue detectada en el noroeste africano.

2. Revisión bibliográfica.

Las arbovirosis son enfermedades o infecciones provocadas por virus (la gran mayoría de tipo ARN) que son transmitidos por artrópodos vectores. Tras la picadura de un vector biológico a un hospedador virémico, el virus es capaz de replicarse en las células del invertebrado, incrementándose de forma significativa los títulos virales en estos artrópodos; el ciclo se completa tras la picadura del vector infectado a un hospedador susceptible.

Muchas de estas virosis son conocidas por su implicación en la sanidad animal y la salud pública; ejemplos de enfermedades zoonóticas son la fiebre amarilla, el dengue, la enfermedad de West Nile o la fiebre del Valle del Rift, entre otras (Mellor, 2000). Por otro lado, la importancia de otras arbovirosis recae en sanidad animal, afectando exclusivamente a las especies animales, tanto domésticas como silvestres destacando, por su carácter emergente y/o reemergente en Europa, la LA y la EHE (Erasmus y Potgieter, 2009; Jiménez-Clavero, 2012).

En la actualidad, tanto la LA como la EHE son enfermedades incluidas en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE y consideradas por esta organización como enfermedades de declaración obligatoria –EDO- (OIE, 2013).

En el ganado doméstico ambas enfermedades

provocan pérdidas directas derivadas de la mortalidad que ocasionan así como disminuciones considerables en la producción en los animales afectados. Así mismo, cabe destacar las pérdidas económicas indirectas asociadas a la restricción de movimientos de animales, semen o embriones de zonas afectadas a las zonas libres de LA y a los gastos originados por la implementación de medidas de lucha frente a la enfermedad. En cuanto a la fauna salvaje, la repercusión de estas enfermedades se relaciona fundamentalmente con los elevados descensos poblacionales que pueden ocasionar en las poblaciones susceptibles (OIE, 2013).

2.1. Lengua azul.

La LA fue descrita por primera vez en Sudáfrica en 1881, denominándose la enfermedad como malaria catarral de los ovinos (Mehlhorn y cols., 2007). En 1902, Spreull detalló el cuadro clínico asociado a la enfermedad (Gür y cols., 2008) y en 1906 Theiler, sugirió que el agente etiológico causante de la LA era un virus.

La enfermedad continuó extendiéndose por todo el continente africano durante el siglo XX. Los primeros brotes fuera de África se registraron en 1924 y posteriormente en 1943 en Chipre, extendiéndose a Turquía y Oriente Medio en el año 1951 (Shimshony, 2004). En Estados Unidos, las primeras evidencias de la enfermedad datan también de comienzos de los años cincuenta, siendo denominada por

Hardy y Price (1954) como *soremuzzle* (llagas en la boca), debido a una de las principales lesiones observadas en el ganado ovino.

Así mismo, durante la década de los años 50, la enfermedad se difundió por diferentes países de la cuenca mediterránea, alcanzando por primera vez el sur de la península Ibérica en 1956. El serotipo implicado en la epizootia fue el serotipo 10 (VLA-10) y ocasionó la muerte de aproximadamente 180.000 ovejas (López y Sánchez-Botija, 1958).

En 1961, se describió la enfermedad por primera vez en el continente asiático (India), extendiéndose posteriormente a otros países como China, Malasia e Indonesia (Sapre, 1964). El primer caso notificado de la enfermedad en Australia data del año 1975 (St George y cols., 1978).

Entre los años 1979-1980, VLA-4 fue detectado en las islas griegas de Rodas y Lesbos, provocando signos clínicos y mortalidad fundamentalmente en pequeños rumiantes. Las regiones afectadas no se declararon libres de la enfermedad hasta 1991 (Gómez-Tejedor, 2004).

Desde finales del siglo XX hasta la actualidad se ha descrito un considerable aumento de los brotes del VLA en Europa, afectando no solo a países de la cuenca mediterránea, sino también en otras zonas más

septentrionales del continente europeo donde la enfermedad no había sido previamente detectada (Mellor y cols., 2008).

En 1998 el VLA reemergió en la cuenca mediterránea europea, detectándose circulación del VLA-1 y VLA-9 en las islas griegas y la zona de los Balcanes. En 1999, la presencia de VLA-16 fue notificada en Croacia, desde donde este serotipo alcanzó primero el norte de Italia y la isla de Córcega (Mellor y Wittmann, 2002; Mellor y cols., 2008). A finales de 1999 se confirmó también la circulación de VLA-2 en el norte de África, llegando este serotipo a las islas de Cerdeña, Sicilia y la península de Calabria en el año 2000, manteniéndose hasta 2002. De nuevo en el año 2003, fue el VLA-4, el que afectó también al sur de Italia y a las islas de Cerdeña y Sicilia (Calistri y cols., 2004; Gómez-Tejedor, 2004; Mellor y cols., 2008).

Durante el año 2004, la presencia del VLA-2 fue declarada en Portugal, sin embargo no se volvió a notificar la presencia de este serotipo en la zona afectada (Gómez-Tejedor y cols., 2004; Anónimo, 2007).

En agosto de 2006 se detecta por primera vez la lengua azul (VLA-8), en latitudes más elevadas del paralelo 45 N, declarándose focos en Alemania, Francia y Países Bajos durante ese mismo año (Mehlhorn y cols., 2007; Elbers y cols., 2008). En 2007, el VLA-8 se extendió en diferentes países del norte de Europa, declarándose los primeros focos

en Reino Unido, Dinamarca y Suecia, considerándolas como las zonas más septentrionales donde el virus ha sido detectado (Rasmussen y cols., 2010). En países como la República Checa y Polonia la circulación del virus también fue detectada ese mismo año (Maan y cols., 2008; Niedbalski, 2010). El VLA ha circulado en estas latitudes durante los últimos años e incluso la presencia de nuevos serotipos como el VLA-1 en el norte de Francia, el VLA-6 en Holanda y Alemania o la de VLA-25 en Suiza fueron notificadas durante el año 2008 (Hoffmann y cols., 2008b; Eschbaumer y cols., 2010).

En los últimos diez años hasta cuatro serotipos diferentes del VLA han sido detectados en España (tabla RB1 y Fig. RB1), afectando tres de ellos a la comunidad autónoma de Andalucía (RASVE, 2013; Gómez-Tejedor, 2004).

El primer brote sucedido en España en el siglo XXI se produjo en las islas Baleares, donde el VLA-2 fue detectado en septiembre de 2002. Al año siguiente, en 2003, fue el VLA-4, también en esta misma zona. Ambos serotipos afectaron fundamentalmente al ganado ovino (RASVE, 2013). Algunos autores sugieren que la entrada de ambos serotipos se produjo como consecuencia de *Culicoides* infectados transportados por el viento procedente del norte de África (Gómez-Tejedor, 2004; Mellor y cols., 2008).

En octubre de 2004 se detecta, por primera vez desde los años 50 del siglo pasado, la circulación de VLA en el

suroeste de la península ibérica. En concreto 332 focos asociados a VLA-4 fueron declarados en España, 268 de ellos en Andalucía, la mayoría de ellos afectando a ganado ovino (RASVE, 2013). El primer foco de este serotipo se reportó en el sur de la provincia de Cádiz a escasos kilómetros de Marruecos, donde el VLA-4 se encontraba circulando durante los meses anteriores a esta primera detección (Hermoso, 2005; EFSA, 2007).

Tras la entrada en vigor del programa de vacunación frente a VLA-4 en el año 2005, el número de focos declarado ese mismo año se redujo a los 88, contabilizándose 48 de ellos en Andalucía (Hermoso, 2005; RASVE, 2013; Allepuz y cols., 2010). En 2006, ningún caso de la enfermedad fue detectado en España.

En julio de 2007 se detectaron los primeros casos asociados a VLA-1 en España, concretamente en Tarifa (Cádiz) extendiéndose rápidamente por el sur de España (Allepuz y cols., 2010). La enfermedad, que estuvo circulando durante 2006 por el norte de Marruecos, se difundió en los meses posteriores a su primera notificación por gran parte del territorio peninsular, alcanzando incluso las zonas limítrofes de Portugal y Francia (RASVE, 2013). La especie ovina resultó ser la más afectada por este serotipo, detectándose su circulación también en otras especies domésticas y salvajes (Allepuz y cols., 2010; García-Bocanegra y cols., 2011).

	Focos de lengua azul en rumiantes domésticos							
	VLA-1		VLA-4		VLA-8		Todos los serotipos	
	A	E	A	E	A	E	A	E
2003	0	0	0	11	0	0	0	11
2004	0	0	268	322	0	0	268	322
2005	0	0	48	88	0	0	48	88
2006	0	0	0	0	0	0	0	0
2007	4.436	7.916	0	0	0	0	4.436	7.916
2008	10	3.008	0	0	16	30	26	3.038
2009	0	423	0	0	6	6	6	429
2010	2	79	8	8	1	1	11	88
2011	0	8	2	2	0	0	2	10
2012	0	4	3	3	0	0	3	7
TOTAL	4.448	11.438	329	434	23	37	4.800	11.909

Tabla RB1.- Focos de LA en Andalucía y en el total del territorio español. (A= Andalucía; E= total de España)

Se notificaron en total 4.436 de brotes provocados por el VLA-1 durante el año 2007 en Andalucía, siendo un total de 7.916 los registrados en España. Tras la puesta en marcha del programa de vacunación, esta cifra decayó en 2008 hasta los 10 focos en Andalucía, registrándose un total de 3.008 brotes en todo el territorio nacional, debido a la expansión de la enfermedad a zonas donde la vacunación no había sido implementada (RASVE, 2013). Hasta la actualidad la circulación del VLA-1 se ha mantenido activa en la península

ibérica (RASVE, 2013)

En enero del año 2008, la presencia de VLA-8 fue detectada por primera vez en el norte de España (Cantabria), y en octubre de ese mismo año se confirmaron los primeros focos en Andalucía (RASVE, 2013). Un total de 26 brotes asociados al VLA-8 han sido declarados en esta comunidad autónoma hasta fecha, confirmándose el último caso en noviembre de 2010. La mayoría de los casos se dieron en explotaciones mixtas de ovino y caprino, situadas en las provincias de Cádiz y Málaga (RASVE, 2013). Las posibles vías de entrada del VLA-8 en Andalucía, incluyen el transporte de animales, semen, embriones o vectores infectados procedentes del norte de Europa. La campaña de vacunación frente a VLA-8 se inició seguidamente a la notificación de los primeros brotes en la zona sur de Andalucía, evitándose su extensión a otras zonas (RASVE, 2013).

También, durante el año 2008, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAGRAMA) dió por concluido el programa de vacunación frente a VLA-4, considerándose a España como zona libre de este serotipo en marzo del año 2009. Sin embargo, en noviembre del año 2010 el virus re-emergió, detectándose circulación en explotaciones bovinas centinelas en el Campo de Gibraltar (RASVE, 2013). En ese mismo año, 2010, cesó el programa de vacunación frente al VLA-8, detectándose el último caso de la enfermedad en noviembre de ese mismo año.

Como consecuencia de la situación epidemiológica existente en zonas como la provincia de Cádiz, el MARM emitió una orden para cesar la campaña de vacunación obligatoria en julio de 2011 frente a los tres serotipos circulantes, pasando ésta a ser voluntariamente aplicada por los ganaderos (BOE, 2011).

En total, 11.909 focos provocados por el VLA han sido declarados en España, contabilizándose un total de 4.800 sólo en Andalucía (RASVE, 2013). Actualmente, aunque las diferentes medidas de erradicación puestas en marcha han logrado remitir la enfermedad clínica en las especies más susceptibles, la circulación de algunos de estos serotipos (VLA-1 y VLA-4) se considera activa en España. Los últimos focos de VLA-4 detectados datan de marzo de 2012, siendo notificada la presencia del VLA-1 por última vez en noviembre de ese mismo año (RASVE, 2013). En enero de 2013, España se declaró libre del VLA-8 (MAGRAMA, 2013).

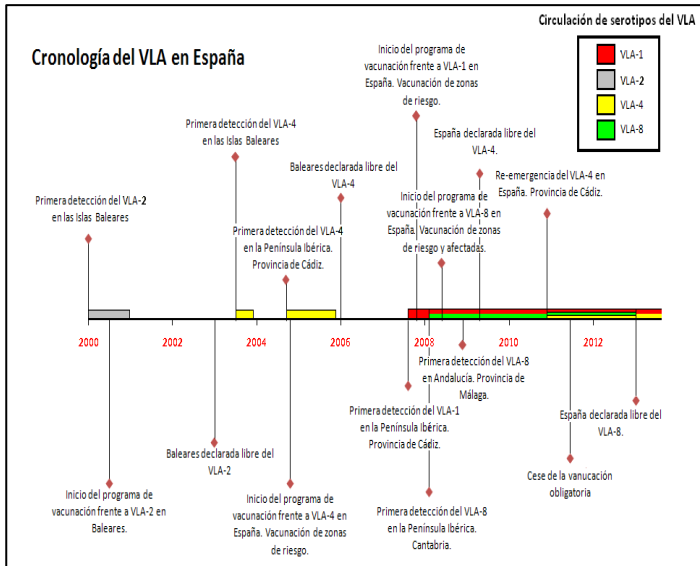


Fig. RB1.- Cronología de la VLA en España desde el año 2000

2.2. Enfermedad hemorrágica epizootica.

La EHE es una enfermedad infecciosa, generalmente de curso agudo y no contagiosa, caracterizada por hemorragias generalizadas y que suele causar una alta mortalidad en cérvidos y pérdidas de producción en la especie bovina, dependiendo del serotipo de virus de la EHE (VEHE) implicado. Al igual que la LA, la EHE es una arbovirosis transmitida por mosquitos del género *Culicoides* (Savini y cols., 2011). Aunque la enfermedad no fue descrita hasta 1955 (Shope y cols. 1959), desde 1890 se venían

observando elevadas mortalidades de esta especie en Estados Unidos causados por este proceso.

La EHE es considerada una enfermedad enzoótica en EEUU donde causa brotes epidémicos en algunas poblaciones de ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) (Stallknetcht y Howerth, 2004). Se han presentado brotes epidémicos de la enfermedad tanto en cérvidos como en bóvidos en Australia, Japón sudeste asiático, Sudáfrica y recientemente en Israel, Túnez y Argelia (Savini y cols., 2011). En septiembre del año 2006 se detectó por primera vez el VEHE-6 en explotaciones bovinas de la zona norte de Marruecos, pasando posteriormente Argelia (Benazzou, 2006). El virus se ha mantenido circulando hasta el año 2008, año en el que se detectó el último brote en la cuenca Mediterránea (Madani y cols., 2011). La presencia del VEHE en el norte de África supone, como ya se ha demostrado para otros orbivirus, un riesgo evidente de introducción del virus en el continente europeo (EFSA, 2009).

2.3. Etiología de los orbivirus.

El género *Orbivirus*, perteneciente a la familia Reoviridae, encuadra a veintidós especies de virus diferentes, (Attoui y cols., 2011). Dentro de este género existen diferentes especies transmitidas por vectores que causan enfermedad en multitud de mamíferos, insectos y plantas. Todos los miembros identificados que afectan a animales son transmitidos por artrópodos vectores o tienen

un insecto como hospedador primario (Verwoerd y cols., 1972). Entre ellos destacan el VLA, el VEHE, el virus de la encefalitis equina (VEE) y el virus de la peste equina africana (VPEA) (Attoui y cols., 2011).

Aunque la mayoría de las investigaciones se han centrado en el VLA, los estudios realizados sugieren que todos los orbivirus presentan una organización estructural muy similar. Tienen una morfología esférica al microscopio electrónico y con un tamaño comprendido entre los 60 y los 80 nm de diámetro (Verwoerd y cols., 1972; Breard y cols., 2004).

Estructuralmente, están integrados por una cápsida externa de naturaleza proteica (Fig. RB2), constituida por 32 capsómeros dispuestos en simetría cúbica icosaédrica; en el interior de esta cápsida se localiza el núcleo interno de la partícula vírica formado por el genoma vírico asociado a algunas proteínas. El genoma se estructura en 10 segmentos de ácido ribonucleico de doble cadena (ds-RNA) con un tamaño de alrededor de 19.000 pares de bases. Cada segmento de ARN codifica al menos para una proteína vírica, incluyendo las proteínas virales (VP) y las proteínas no estructurales (NS).

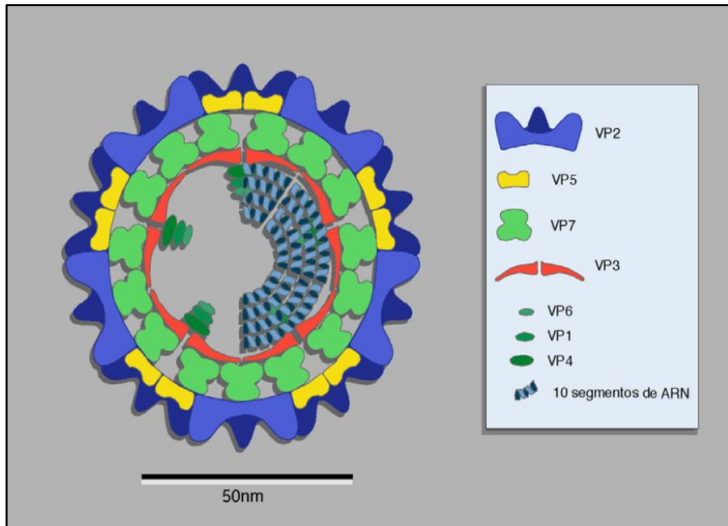


Fig. RB2.-Estructura de un orbivirus según Mertens y cols. (2005).

El núcleo está compuesto por 3 proteínas menores asociadas al genoma, la VP1, la VP4 y la VP6, así como dos proteínas mayores, la VP3 y la VP7 (Verwoerd y cols., 1972; Huisman y cols., 1987). La cápsida externa que rodea al núcleo está constituida por 2 proteínas específicas del virus, la VP2 y la VP5 que determinan su variabilidad antigénica (Mertens y cols., 1989).

Las proteínas no estructurales se localizan en la superficie del virus y se reconocen la NS1, la NS2, la NS3 y la recientemente descubierta NS4 (Mertens y cols., 1984; Roy y

cols., 1990; Gorman, 1992; Ratinier y cols., 2011).

Mediante seroneutralización vírica (SNV) y técnicas moleculares basadas a la proteína VP2, se han podido identificar hasta veintiséis serotipos diferentes del VLA y ocho del VEHE (Parsonson y Snowdon, 1985; Roy, 1992; Mertens y cols., 2005; Attoui y cols., 2011).

Se ha demostrado que la mayor parte de los epítomos involucrados en la SNV se encuentran en la VP2, que está codificada por el segmento 2 (SEG-2) del genoma vírico, por lo tanto la cadena nucleotídica de este segmento es la que determina en gran medida el serotipo del virus, mostrando éste mayor variabilidad genética (y por tanto antigénica) que otros segmentos (Mertens y cols., 1989).

Pero, aunque existen similitudes filogenéticas basadas en análisis del SEG-2 entre algunos serotipos (Fig. RB3), la influencia que la proteína VP5 ejerce sobre la proteína VP2 puede alterar la conformación morfológica originaria de esta proteína afectando decisivamente a la estructura antigénica del virus (Maan y cols., 2007).

Así pues, dada la elevada variabilidad genética de la VP2 y la presencia de otras proteínas que interfieren en la conformación de esta proteína antigénica, cada uno de los serotipos se comportan antigénicamente como virus diferentes, existiendo escasa inmunidad cruzada entre ellos (Erasmus, 1990).

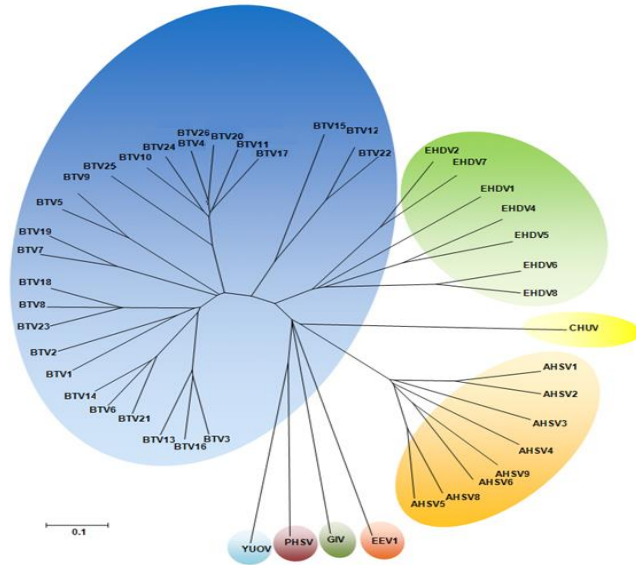


Fig. RB3.- Clasificación filogenética de los orbivirus. *Orbivac.eu*.

No obstante, la aparición de reacciones cruzadas mediante el uso de técnicas serológicas o moleculares también han sido descritas y se producen entre serotipos del mismo virus, pero también entre diferentes especies víricas, como se ha descrito entre el VLA y VEHE (Agüero y cols., 2008b; Rodríguez-Sánchez y cols., 2010).

Los orbivirus presentan una elevada estabilidad entre los 4 y los 20°C. Las temperaturas de congelación superiores a -70°C, permiten la conservación de las estructuras virales pero no la viabilidad del agente. Son virus poco viables en

medios ácidos, manteniéndose estables únicamente a un pH entre 6,5 y 8. Son poco resistentes a los inactivantes físicos como las radiaciones ultravioletas y los rayos gamma. Son muy sensibles a las soluciones que contienen ácidos, álcalis, hipoclorito sódico y yodóforos, aunque resisten bien los solventes lípidos (Erasmus, 1990).

2.4. Epidemiología.

Generalmente, se considera que la distribución de las arbovirosis está asociada a la dispersión de sus vectores competentes y a la presencia de hospedadores susceptibles que conjuntamente posibilitan el mantenimiento la enfermedad (Erasmus y Potgieter, 2009). Hasta finales del pasado siglo XX, ambas enfermedades se encontraban delimitadas entre el paralelo 35 del hemisferio sur y el 40 del hemisferio norte, afectando a diferentes zonas distribuidas por el continente africano, Asia meridional y áreas templadas del continente americano, con incursiones puntuales en la zona del Mediterráneo (Roy, 1992; Purse y cols., 2005). Sin embargo, la distribución de estas enfermedades ha alcanzado en los últimos años zonas tradicionalmente más frías, hecho que ha sido asociado al aumento global de las temperaturas que ha provocado la adaptación de los vectores a nuevas localizaciones (Purse y cols., 2005; Hoffmann y cols., 2008a; Rassmussen y cols., 2010). En la actualidad, el rango latitudinal de la LA se ha redefinido entre los 34°S y los 53°N (MAGRAMA, 2013).

El género *Culicoides*, perteneciente a la familia *Ceratopogonidae* cuenta con una gran cantidad de subgéneros y especies diferentes, muchas de ellas implicadas en la transmisión de diversas enfermedades víricas y parasitarias (Meiswinkel, y cols., 2008).

Los culicoides, también conocidos en el continente americano como *beatillas*, tienen un tamaño que oscila entre 1-3 mm, con una morfología más o menos redondeada. Poseen un aparato picador de tipo cortador-chupador que tiene una longitud similar a la de la cabeza. Las patas son cortas y las dos alas de aspecto manchado (Vega y cols., 2005).

Los culicoides son artrópodos holometábolos, presentando un ciclo de metamorfosis complejo. Las hembras ponen huevos alargados, que presentan una longitud entre 200-500 μm ; tras un periodo comprendido entre 2-8 días nacen las larvas que presentan una morfología vermiforme y que realizan un total de tres mudas en tres semanas, que acaban con su transformación en pupas. Finalmente la pupa se transforma en la forma adulta tras un periodo de entre 3-10 días. El mosquito en su forma adulta puede sobrevivir entre 40-60 días con condiciones climáticas favorables (Mullens y Hoolbrook, 1991).

El ciclo biológico de los culicoides puede presentar una duración de 15 días, con temperaturas comprendidas entre 28°C y 35°C. Con temperaturas inferiores a 15°C se reduce el

metabolismo y las larvas suelen ser viables alrededor de 9 meses, lo cual en muchas ocasiones les permite sobrevivir a la época invernal. Temperaturas por debajo de 0°C o superiores a 40°C, hacen que mueran en cualquiera de las fases (Mellor y cols., 2000).

Las larvas suelen establecerse en lugares húmedos como las riberas de los ríos o arroyos, zonas de humedales, charcas o construcciones artificiales que presenten condiciones de elevada humedad, ricas en materia orgánica como los establos y zonas de confinamiento del ganado. Los adultos se mueven en las horas nocturnas y crepusculares siendo especialmente activos durante el verano y el otoño (Vega y cols., 2005).

Machos y hembras se alimentan de sustancias azucaradas, como néctar de flores o savia de plantas, incluso pueden parasitar a los pulgones y a otros insectos. En estas especies, las hembras necesitan además ingerir sangre de vertebrados (mamíferos y/o aves) para alcanzar la maduración y el desarrollo de los huevos. Las larvas se alimentan de materia orgánica (Lucientes y cols., 2005).

Para que las hembras fértiles desarrollen los huevos deben alimentarse de sangre, generalmente de mamífero, donde suelen buscar zonas de piel poco gruesa (orejas, abdomen, axilas, región inguinal o extremidades), ingiriendo un volumen de sangre aproximado de 10^{-4} ml en cada picadura. El periodo de tiempo entre una toma de sangre y

otra oscila entre los 4 ó 5 días dependiendo de la temperatura ambiente (Mellor y cols., 2000; Lucientes y cols., 2005).

Si el culicoides ingiere sangre de un animal infectado con un orbivirus, éste alcanza primeramente el intestino del artrópodo pero, debido al medio hostil existente en la luz intestinal, los títulos virales descienden durante unos dos días; es la conocida como *fase de eclipse*. Posteriormente se produce una primera amplificación, en la que se infecta el mesenterio y la pared del intestino (Mellor y cols., 2000).

Más adelante, en una segunda amplificación, los títulos virales en el vector se incrementan considerablemente, quedándose en una fase de meseta que se mantiene durante toda la vida del artrópodo (Mellor y cols., 2000). En esta segunda fase, se infectan el resto de órganos susceptibles, entre ellos el tejido de las glándulas salivares, donde el virus se multiplica activamente para finalmente ser liberado con la saliva (Mellor y cols., 2000). Algunos autores sugieren que la replicación vírica en los órganos reproductivos del insecto puede originar un ciclo de transmisión transovárica (Darpel y cols., 2009).

La transmisión al hospedador vertebrado puede resultar efectiva a los 10-14 dpi, en condiciones de temperatura adecuada [$\approx 25^{\circ}\text{C}$] (Chandler y cols., 1985). Una vez alcanza este periodo, la picadura de un solo insecto es suficiente para infectar a una oveja susceptible (Mellor y

cols., 2000).

Existen numerosas especies del género *Culicoides* que han sido identificadas como transmisoras de los orbivirus. Precisamente, para considerar como transmisor efectivo a un vector es preciso que cumpla una serie de premisas como es que esté presente en la zona del brote, que sea susceptible a la infección por un determinado virus y también la capacidad de transmisión de éste; sin embargo, existen otros condicionantes que también influyen determinadamente, como la abundancia del vector en la zona o los hábitos de este (Mellor y cols., 2008).

En España se han descrito más de 81 especies (tabla RB2) diferentes del género *Culicoides* (Ortega y cols., 1998; Ortega y cols., 1999; Pérez y cols., 2012; González y cols., 2013). La zona donde generalmente se han descrito mayores densidades de culicoides ha sido el suroeste de la Península Ibérica, siendo precisamente aquí donde el VLA ha circulado tradicionalmente (Mellor y cols., 2008, Acevedo y cols., 2010).

Subgénero	Especies	Subgénero	Especies
Avaritia	<i>C. chiopterus</i>	Oecacta	<i>C. jumineri</i>
	<i>C. dewulfi</i>		<i>C. kibunensis</i>
	<i>C. imicola</i>		<i>C. kurensis</i>
	<i>C. montanus</i>		<i>C. longipennis</i>
	<i>C. obsoletus</i>		<i>C. malevillei</i>
	<i>C. scoticus</i>		<i>C. maritimus</i>
Beltranmyia	<i>C. brevifrontis</i>		<i>C. paradisionensis</i>
	<i>C. circumscriptus</i>		<i>C. pictipennis</i>
Culicoides	<i>C. almeidae</i>		<i>C. poperinghensis</i>
	<i>C. deltas</i>		<i>C. pseudoheliophilus</i>
	<i>C. fagineus</i>		<i>C. pseudopallidus</i>
	<i>C. flavipulcaris</i>		<i>C. santonicus</i>
	<i>C. impunctatus</i>		<i>C. semimaculatus</i>
	<i>C. lupicaris</i>		<i>C. shaklawensis</i>
	<i>C. newsteadi</i>		<i>C. simulator</i>
	<i>C. pulcaris</i>		<i>C. submaritimus</i>
	<i>C. punctatus</i>		<i>C. truncorum</i>
	<i>C. subfagineus</i>		<i>C. univitatus</i>
Monoculicoides	<i>C. helveticus</i>		<i>C. vexans</i>
	<i>C. nubeculosus</i>		<i>C. vidourlensis</i>
	<i>C. parroti</i>	<i>C. saevus</i>	
	<i>C. puncticollis</i>	<i>C. sejfadinei</i>	
Género dudoso	<i>C. riethi</i>	Pontoculicoides	<i>C. tauricus</i>
	<i>C. stigma</i>	<i>C. achrayi</i>	
	<i>C. analis</i>	<i>C. fascipennis</i>	
Oecacta	<i>C. alazanicus</i>	Silvaticulicoides	<i>C. pallidicornis</i>
	<i>C. begueti</i>		<i>C. picturatus</i>
	<i>C. brunnicans</i>		<i>C. subfascipennis</i>
	<i>C. cataneii</i>	Synhelea	<i>C. accraensis</i>
	<i>C. clastrieri</i>		<i>C. coluzzii</i>
	<i>C. comosioculatus</i>		<i>C. corsicus</i>
	<i>C. derisor</i>		<i>C. sahariensis</i>
	<i>C. duddingstoni</i>		<i>C. yemenensis</i>
	<i>C. dzhafarovi</i>		<i>C. minutissimus</i>
	<i>C. festivipennis</i>	Wirthomyia	<i>C. segnis</i>
	<i>C. furcillatus</i>	Indefinido	<i>C. bahrainensis</i>
	<i>C. gejjelensis</i>		<i>C. indistinctus</i>
	<i>C. griseidorsum</i>		<i>C. marletti</i>
	<i>C. haranti</i>		<i>C. odiatus</i>
	<i>C. heliophilus</i>		<i>C. paolae</i>
	<i>C. heteroclitus</i>		

Tabla RB2. Especies del género *Culicoides* detectados en España hasta 2012, según Alarcón-Elbal y Lucientes, (2012).

La especie *Culicoides imicola* es considerada como la principal implicada en la transmisión en los diferentes brotes de orbivirus acontecidos en la cuenca mediterránea y en otras localizaciones próximas del continente asiático y africano (Ortega y cols., 1998; Mellor y cols., 2004, Savini y cols., 2011; Pérez y cols., 2012). Diferentes estudios han evidenciado que la re-emergencia de la LA en los países del sur de Europa presenta a menudo un origen común en la entrada de *C. imicola* infectados procedentes del norte de África (Alba y cols., 2004; Hermoso, 2005; Purse y cols., 2005; Calvete y cols., 2008).

Los estudios experimentales de infección con VLA realizados para *C. imicola* demuestran la competencia de esta especie para replicar y transmitir el virus a hospedadores susceptibles (Mellor, 2004; Venter y cols., 2011; Del Río y cols., 2012). *C. imicola* se ha mostrado igualmente, como un vector potencial en la transmisión del VEHE (Aradaib y cols., 1999; Paweska y cols., 2005). Aunque su transmisión en condiciones de laboratorio no ha sido demostrada, la abundante presencia de *C. imicola* en zonas donde el VEHE se encontraba circulando, como el norte de África u Oriente medio, sugieren la implicación de esta especie en la epidemiología de la enfermedad (Kedimi y cols., 2010; Madani y cols., 2011).

Sin embargo, la escasa presencia y abundancia de *C. imicola* en los en los países del norte de Europa, indican que

existen otras especies que determinan el ciclo epidemiológico del VLA en estas localizaciones (Caracappa y cols., 2003; Torina y cols., 2004). Generalmente los recientes brotes acontecidos en las zonas más septentrionales del continente europeo se han asociado a las especies del Complejo *obsoletus*, particularmente *C. obsoletus*, *C. chiopterus*, *C. dewulfii* y *C. scoticus* (Lehmann y cols., 2012). La presencia de estas especies ha sido descrita también en algunas zonas del Mediterráneo, entre las que se incluye Andalucía, aunque con menores densidades (Pérez y cols., 2012). En el norte de España las especies del Complejo *obsoletus* se encuentran ampliamente difundidas y presentan elevadas densidades, predominando en estas zonas sobre *C. imicola* (Calvete y cols., 2008, Acevedo y cols., 2010).

La capacidad para transmitir el VLA por parte de las especies pertenecientes al Complejo *obsoletus* ha sido puesta de manifiesto por varios autores (Carpenter y cols., 2006; Baldet y cols., 2008; Stephan y cols., 2009). Por el contrario, en el caso del VEHE, la susceptibilidad a la infección en estas especies aún no ha sido evidenciada (Savini y cols., 2011).

Las especies del Complejo *pulicaris* (*C. pulicaris*, *C. punctatus*, *C. newsteadi*, *C. lupicaris*, *C. halophilus* y *C. impunctatus*), también han sido descritas en numerosas localizaciones del continente europeo extendiéndose desde

las zonas orientales del mediterráneo hasta las noroccidentales de Europa (Gofreddo y cols., 2004; De Deken y cols., 2008). En España estas especies han sido frecuentemente detectadas en el norte peninsular y, de manera más esporádica, en el sur de la Península Ibérica, generalmente con escasa abundancia (Pérez y cols., 2012; Romón y cols., 2012).

Otras especies del género *Culicoides* como: *C. nubeculosus*, *C. circumscriptus* o *C. festivipennis*, se han presentado frecuentemente en diversas localizaciones del continente europeo, entre las que se encuentra España, sin embargo su implicación en la epidemiología de la enfermedad no es aun bien conocida (Meiswinkel y cols., 2007; Dijkstra y cols., 2008; Pérez y cols., 2012, González y cols., 2013).

En el continente africano y oriente medio *C. schultzei* y por supuesto *C. imicola*, son las especies con una mayor distribución e implicación en la transmisión del VLA y VEHE. En otras localizaciones del mundo, como en Norteamérica, los vectores implicados en la transmisión del VLA y de la VEHE son fundamentalmente *C. sonorensis*, *C. varipennis* y *C. insignis*; este último también asociado a la dispersión de estas enfermedades en el centro y sur de América (Tanya y cols., 1992; Mecham y Nunamaker, 1994; Purse y cols, 2005; Savini y cols., 2011). En Asia, los principales vectores son *C. imicola*, presente en zonas occidentales de este continente,

existiendo otras especies como *C. yanase* en la zona de Japón, o *C. brevitarsis* relacionada con la transmisión del ambos virus en el sureste asiático y Oceanía (St George y cols, 1983; Wirth y Hubert, 1989).

Desde las primeras descripciones de ambos virus, estos han estado ligados a la presencia de especies del genero *Culicoides*, sin embargo la infección y capacidad de transmisión de otras especies de artrópodos ha sido descrita en el VLA en condiciones experimentales. Entre estas especies podemos tener en cuenta las garrapatas duras de la familia *Argasidae*, las garrapatas blandas de la familia *Ixodidae* (Bowknecht y cols., 2010), así como otros géneros de garrapatas blandas norteamericanas como *Ornithodoros coriaceus* (Stott y cols., 1985). También las moscas de la familia *Hippoboscidae*, como *Malophagus ovinus*, que parasita frecuentemente al ganado ovino, podrían estar implicadas en la transmisión de los orbivirus (Luedke y cols., 1965). No obstante, aunque estos virus pueden replicarse en los tejidos de diferentes artrópodos distintos de *Culicoides*, la capacidad de amplificación de elevados títulos virales aún no ha sido demostrada por lo que su papel en la transmisión como vectores competentes para los orbivirus es muy probablemente residual (Bowknecht y cols., 2010).

En general, se considera a los rumiantes (domésticos y salvajes) como los hospedadores definitivos de la LA y de la EHE. El VLA puede afectar también a otras especies como

camélidos o carnívoros, susceptibles de padecer infección e incluso enfermedad clínica (OIE, 2009).

La LA ha estado asociada al ganado ovino desde su primera descripción a finales del Siglo XIX en Sudáfrica. La enfermedad presentó una clínica más evidente en ovinos de lana fina próximos al tronco merino, que coincide con el tipo de ganado existente en el suroeste de la Península Ibérica (López y Sánchez-Botija, 1958; Koumbati y cols., 1999). La virulencia de la LA está directamente relacionada con el serotipo y las especies implicadas, lo que implica una gran divergencia entre los indicadores epidemiológicos existentes en la bibliografía.

El VLA-4 provoca una baja morbilidad (1,88 por ciento), como se constató durante el brote ocurrido en el año 2003 en las Islas Baleares, la mortalidad encontrada fue media, alcanzando en 9,65 por ciento. Sin embargo los porcentajes de letalidad sí se presentan como elevados oscilando entre el 32,3 y el 72,7 por ciento (Siquier Vigrós, 2005).

Allepuz y cols. (2010) determinaron una morbilidad en Andalucía en ganado caprino y bovino infectados por el VLA-1 inferior al 2 por ciento, oscilando entre el 6 y el 15 por ciento en ganado ovino. En el brote descrito en el País Vasco por García-Lastra y cols. (2012) las tasas de morbilidad son más elevadas en el ganado caprino (6%) seguido del bovino y el ovino (2%).

Existen variaciones en cuanto a las tasas de mortalidad en ovino, siendo por lo general inferiores al 5 por ciento. En este sentido, las tasas de letalidad encontradas en ovino son usualmente elevadas, oscilando entre el 30 y el 70 por ciento (McKercher y cols., 1953; Allepuz y cols., 2010; García-Lastra y cols., 2012). En el caso del ganado caprino las tasas de mortalidad expuestas son del 2 por ciento, situándose la letalidad en un 45 por ciento. En el caso del ganado bovino, no se describieron casos de mortalidad en Andalucía (Allepuz y cols., 2010). En el brote del País Vasco las tasas de mortalidad en ganado caprino y bovino se situaron en torno al 3 por ciento y al 0,5 por ciento, respectivamente (García-Lastra y cols., 2012)

Durante el brote del año 2007 provocado por VLA-1 en Andalucía las explotaciones de ovino resultaron las más afectadas representando el 71,3 por ciento del total de los brotes clínicos, seguida de las explotaciones mixtas con un 25,8 por ciento. Las granjas de caprino y de bovino representaron un porcentaje del 2,6 y el 0,2 por ciento respectivamente (Arenas y cols., 2008; Allepuz y cols., 2010).

La morbilidad hallada en España en el centinelaje de las zonas afectadas por VLA-8 resultó del 2 por ciento, no observándose mortalidad en los animales positivos (RASVE, 2010). Sin embargo, los datos existentes para este serotipo en el norte de Europa ofrecen letalidades cercanas al 30 por ciento en ovejas y del 5 por ciento en la especie bovina

(Szmaragd y cols., 2007).

Aunque existe abundante información referida al papel que desempeñan las diferentes especies de rumiantes domésticos en la epidemiología de la LA, la información relacionada con los ungulados silvestres sigue siendo limitada, principalmente en Europa. Precisamente, en este continente han venido circulando diversos serotipos del VLA en los últimos años y por ello hemos encontrado numerosas referencias de infección en diferentes especies de rumiantes silvestres. El ciervo es la especie más distribuida en Europa y la que presenta mayores tasas de seroprevalencia frente al VLA, oscilando entre el 22 por ciento y el 66 por ciento en países como Bélgica, España y Francia (Linden y cols., 2008; Ruiz-Fons y cols., 2008; García y cols., 2009; Rossi y cols., 2009; Linden y cols., 2010; Corbiere y cols., 2012; Rossi y cols., 2013).

La presencia de ARN del VLA ha sido detectada en ciervos del sur de España (Ruiz-Fons y cols., 2010; García-Bocanegra y cols., 2011; Falconi y cols., 2012) y en Francia (Corbiere y cols., 2012).

Las poblaciones de gamo también han mostrado evidencia serológica frente al virus, con porcentajes de seropositividad que oscilan entre el 0,5 por ciento reportado en Italia y el 35 por ciento descrito en España (De Curtis y cols., 2007; Ruiz-Fons y cols., 2008; García y cols., 2009). Por su parte, en el corzo también se ha informado la circulación

del VLA en Bélgica, Francia y España, mostrándose en todos los casos seroprevalencias inferiores al 5 por ciento, (Ruiz-Fons y cols., 2008; Boadella y cols., 2010; Linden y cols., 2010; Rossi y cols., 2013). Para ayudar a conocer la distribución espacial del VLA en Europa en estos últimos años y las especies de rumiantes silvestres implicadas, hemos elaborado la siguiente tabla (RB 3).

La detección de anticuerpos en muflón ha sido exclusivamente confirmada en España, con porcentajes de positividad entre el 13 y el 33 por ciento (Ruiz-Fons y cols., 2008; García y cols., 2009). Además, en esta especie se han descrito manifestaciones clínicas y lesiones y se ha detectado la presencia de ARN del virus (Fernández-Pacheco y cols., 2008; Rodríguez-Sánchez y cols., 2010). Por el contrario, en el estudio de Corbiere y cols. (2012) realizado en Francia no se encontró seropositividad frente al VLA.

La presencia de anticuerpos y de ARN del VLA también ha sido detectada en cabra montés. Las seroprevalencias obtenidas en esta especie oscilaron entre el 4 y el 11 por ciento (García y cols., 2009; Lorca-Oró y cols., 2011; Santiago-Moreno y cols., 2011). En Francia, se ha encontrado un porcentaje del 1,6 por ciento de individuos seropositivos frente al VLA en íbices alpinos, una especie muy cercana filogenéticamente a la cabra montés (Rossi y cols., 2009).

Especie	País	Seroprevalencia	Años de muestreo	Referencia
Arrui	España	25,0	2005-2007	Ruiz-Fons y cols., 2008
	España	25,0	2006-2007	García y cols., 2009
Cabra montés	España	4,0	2006-2009	Lorca-oró y cols., 2011
	España	5,8	2009	Santiago y cols., 2010
	España	10,8	2006-2007	García y cols., 2009
Íbice alpino	Francia	1,6	2008	Rossi y cols., 2009
Ciervo	Bélgica	1,5	2006	Linden y cols., 2010
	Bélgica	34,0	2008	Linden y cols., 2010
	Bélgica	40,4	2007	Linden y cols., 2008
	Bélgica	52,3	2007	Linden y cols., 2010
	España	12,9	2005-2010	Falconi y cols., 2012
	España	21,9	2005-2007	Ruiz-Fons y cols., 2008
	España	66,3	2006-2007	García y cols., 2009
	España	57,6	2007	Rodríguez y cols., 2010
	Francia	24,3	2010	Rossi y cols., 2013
	Francia	37,3	2008	Rossi y cols., 2009
	Francia	47,1	2009	Rossi y cols., 2013
	Francia	50,2	2008-2010	Corbiere y cols., 2012
Corzo	Bélgica	1,7	2008	Linden y cols., 2010
	Bélgica	2,6	2006	Linden y cols., 2010
	Bélgica	2,8	2007	Linden y cols., 2010
	España	0,0	2007-2010	Boadella y cols., 2010
	España	5,1	2005-2007	Ruiz-Fons y cols., 2008
	Francia	0,0	2008-2010	Corbiere y cols., 2012
	Francia	1,2	2008	Rossi y cols., 2009
Gamo	España	35,4	2005-2007	Ruiz-Fons y cols., 2008
	España	50,0	2006-2007	García y cols., 2009
	Italia	0,5	2004-2005	De Curtis y cols., 2005
Muflón	España	13,2	2005-2007	Ruiz-Fons y cols., 2008
	España	33,3	2006-2007	García y cols., 2009
	Francia	0,0	2008-2010	Corbiere y cols., 2012
Rebeco	Francia	1,0	2008-2010	Corbiere y cols., 2012
	Francia	1,1	2008	Rossi y cols., 2009

Tabla RB 3. Seroprevalencias en rumiantes silvestres europeos

En el arruí, localizados mayoritariamente en el sureste de España, también se ha confirmado la presencia de animales seropositivos frente al VLA con prevalencias que alcanzaron el 25 por ciento (Ruiz-Fons y cols., 2008; García y cols., 2009). El contacto serológico y la presencia de ARN del VLA también ha sido evidenciada en el rebeco (*Rupicapra rupicapra*) en Francia, aunque las prevalencias serológicas resultaron muy bajas, cercanas al 1 por ciento (Rossi y cols., 2009; Corbiere y cols., 2012)

En Norteamérica, existen numerosas especies susceptibles de sufrir la infección y padecer el cuadro clínico. Particularmente susceptible se muestra ciervo de cola blanca del que se han detectado seroprevalencias que oscilaron entre el 5 y el 91 por ciento, dependiendo de la localización y el serotipo (Vosdingh y cols., 1968; Murray y Trainer, 1970; Hoff y cols., 1974; Odiawa y cols., 1985; Johnson y cols., 1986; Kocan y cols., 1987; Stallknecht y cols., 1991; Stallknecht y Davidson 1992; Work y cols., 1992; Stallknecht y cols., 1995; Martínez y cols., 1999). En el ciervo mulo (*Odocoileus hemionus*) se han encontrado prevalencias de entre el 20 y el 30 por ciento en zonas donde previamente se había demostrado la circulación del VLA en otras especies domésticas y salvajes (Couvillion y cols., 1980; Roug y cols., 2012).

Otros rumiantes norteamericanos en los que se ha evidenciado la enfermedad clínica son el bisonte americano

(*Bison bison*) (Howerth y cols., 2001; Tessaro y Clavijo, 2001), el carnero de las rocosas (*Ovis canadensis*), que presenta una clínica muy parecida a la de las ovejas (Robinson y cols., 1967, Singer y cols., 1998), y el berrendo (*Antilocapra americana*) (Thorne y cols., 1988).

Aunque la presencia de signos clínicos y lesiones han sido descritos en estas especies silvestres, es el ciervo de cola blanca y el berrendo en los que se han descrito frecuentemente cuadros de mortalidad asociados al virus (Thorne y cols., 1988; Stallknecht y Howerth, 2004).

En otros continentes, como África o el sudeste asiático, la enfermedad está considerada endémica en la mayoría de países, no detectándose elevadas mortalidades entre la fauna salvaje autóctona (Hamblin y cols., 1990). En el continente africano son varias las especies en las que se ha evidenciado la presencia de anticuerpos frente al VLA, entre ellas destacan antílopes como el blesbock (*Damaliscus pygargus*) (Bender y cols., 2003), el alcélafo (*Alcelaphus buselaphus*), el ñu azul (*Connochaë testaurinus*), el topi (*Damaliscus korrigum*), el antílope de agua (*Kobuselli psiprymnus*), el impala (*Aepyceros melampus*) (Hamblin y cols., 1990) o la gacela de montaña (*Gazella gazella*) (Barzilai y Tadmor, 1972) y también bóvidos como el búfalo cafre (*Syncerus caffer*).

En antílopes asiáticos la infección se ha descrito en diversas especies silvestres como el órix árabe (*Oryx*

leucoryx) (Frolichy cols., 2005) o la gacela persa (*Gazella subgutturosa subgutturosa*) (Gür y cols., 2008). Curiosamente en Bélgica se detectó presencia de anticuerpos en yaks (*Bosgrunniens grunniens*), especie originaria de Asia, criados en cautividad (Mauroy y cols., 2008).

También se ha informado de la presencia de anticuerpos en diferentes especies de herbívoros salvajes no rumiantes como elefante africano (*Loxodonta africana*) (Formenty y cols., 1994), rinoceronte negro (*Diceros bicornis*) y rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum*) (Anderson y Rowe, 1998; Fischer-Tenhagen y cols., 2000).

En camélidos, tanto en salvajes como en domésticos, también se han encontrado evidencias de la infección e incluso de la enfermedad clínica en llama (*Lama glama*), alpaca (*Vicugna pacos*) o dromedario (*Camelus dromedarius*) (Rivera y cols., 1987; Afshar y cols., 1995; Ortega y cols., 2010; Batten y cols., 2011)

También en carnívoros existen diferentes casos de infecciones que suelen estar asociadas a consumo de carne de animales infectados por el VLA. Se han detectado casos en el licaón (*Lycaon pictus*), guepardo (*Acinonyx jubatus*) (Alexander y cols., 1994) y lince boreal (*Lynx lynx*), produciéndose en este último caso la muerte de los dos individuos por consumo de un cordero infectado (Jauniaux y cols, 2008). Infecciones en perro doméstico causadas por

vacunas contaminadas también han sido descritas (Akita y cols., 1994). Otras especies en las que se ha encontrado presencia de anticuerpos frente al virus son el oso negro (*Ursus americanus*) de Florida (EEUU) (Dunbar y cols., 1998) y el jabalí (Sugiyama y cols., 2009), especie muy abundante en los ecosistemas mediterráneos.

Al igual que el VLA, el VEHE es capaz de infectar a rumiantes domésticos y salvajes. Desde la primera descripción en Norteamérica la enfermedad, se ha asociado a cérvidos silvestres, principalmente al ciervo de cola blanca (Stallknecht y Howerth, 2004), pero actualmente la EHE está siendo detectada repetidamente en diferentes países del norte de África donde se han descrito casos en el ganado bovino (Madani y cols., 2011).

La especie bovina se ve generalmente afectada por serotipos concretos como del VEHE-2, agente etiológico de la enfermedad de Ibaraki detectado en Japón en los años 60 (Omori y cols., 1969). Más recientemente, en los brotes mediterráneos provocados por VEHE-6 y VEHE-7, se han descrito signos clínicos como fiebre, taquicardia y taquipnea, así como lesiones en la mucosa oronasal y presencia de edema en los párpados, pero sin describirse mortalidad en estas explotaciones (Temizel y cols., 2009; Kedimi y cols., 2010; Madani y cols., 2011).

En caprino y ovino se ha detectado la presencia de ARN vírico y de anticuerpos, lo que confirma la

susceptibilidad a la infección en estas especies, sin embargo ni signos clínicos ni lesiones asociadas a la enfermedad han sido descritas en pequeños rumiantes (Gibbs and Lawman, 1977; Tomori, 1980; Thompson y cols., 1988; Nol y cols., 2010; Kedimi y cols., 2011). No obstante, la información acerca de la susceptibilidad a la infección frente al VEHE y el papel epidemiológico de muchas especies de rumiantes domésticos y salvajes es aún limitada (Kedimi y cols., 2011).

Entre las especies silvestres, la más afectada es el ciervo de Virginia en el que las seroprevalencias llegan a ser muy elevadas, oscilando entre el 3 y el 83 por ciento en algunas zonas de Norteamérica (Odiawa y cols., 1985; Johnson y cols., 1986; Stallknecht y cols., 1991; Stallknecht y Davidson 1992; Martínez y cols., 1999). Sin embargo, es la susceptibilidad de este cérvido al VEHE la que confiere la verdadera trascendencia de la enfermedad en poblaciones salvajes en Norteamérica; así, se han descrito signos clínicos muy severos y mortalidades cercanas al 8 por ciento que provocaron descensos considerables en sus poblaciones naturales (Beringer y cols., 2000; Gaydos y cols., 2004; Stallknecht y Howerth, 2004).

El ciervo mulo se muestra también susceptible a la infección presentando porcentajes de seropositividad situados entre el 7 y el 30 por ciento, aunque algunos autores destacan resultados más elevados (Johnson y cols., 1986; Chomel y cols., 1994; Dubay y cols., 2006; Roug y cols.,

2012).

El berrendo es otra de las especies sensibles a padecer la infección por el VEHE, acompañada casi siempre de signos clínicos y lesiones que en algunas ocasiones han causado grandes descensos poblacionales (Thorne y cols., 1988; Dunbar y cols., 1999; Dubay y cols., 2006).

Por el contrario, otras especies de rumiantes salvajes como el wapití (*Cervus elaphus canadensis*) o el bisonte americano presentan susceptibilidad a la infección, pero no se ha detectado clínica aparente en estos (Gibs y Lawman, 1977; Gaydos y cols., 2004; Nol y cols., 2010). En este sentido, algunas infecciones experimentales llevadas a cabo en especies europeas como el ciervo, el gamo o el corzo, también han presentado seropositividad sin evidencia clínica (Gibbs y Lawman, 1977).

El *overwintering*, que puede traducirse al español como hibernación, es un término epidemiológico ampliamente aceptado que describe el proceso por el cual los arbovirus son capaces de sobrevivir a la temporada invernal, época que resulta menos propicia para la supervivencia del vector (Reeves, 1974; Sellers y Mellor, 1993). En el caso de los dos agentes estudiados, tanto el VLA como el VEHE han mostrado esta capacidad de re-emerger año tras año (Takamatsu y cols., 2003; Allison y cols, 2010; Napp y cols., 2011). Sin embargo, la información disponible sobre las causas que determinan el *overwintering* en estas

enfermedades es hasta la fecha muy limitada. Las hipótesis más plausibles se han asociado tradicionalmente al comportamiento del virus, bien en los vectores o bien en los hospedadores vertebrados.

Las teorías que apuntan a que la supervivencia del virus se lleva a cabo en el vector presentan vertientes muy diferentes. Así, algunas hipótesis sugieren que la reemergencia de la LA viene determinada por la entrada, en las épocas más cálidas, de culicoides infectados desde zonas de clima tropical o subtropical en las que el vector está presente todo el año (Mellor, 1994). Sin embargo, otra hipótesis es que en lugares especialmente propicios como zonas estercoladas, naves ganaderas o establos, algunos insectos pueden sobrevivir durante la época invernal (Sellers y Mellor, 1993; Napp y cols., 2011).

Otra teoría está fundamentada en la transmisión transovárica, que viene determinada por la replicación del virus en el tejido del aparato reproductor de las hembras de culicoides, transmitiendo ésta infección a la descendencia (White y cols., 2005). Como se ha demostrado que el vector en estado larvario puede aguantar hasta 9 meses si las condiciones le son favorables, una vez pasada la estación fría y alcanzado el estado adulto, éste podría actuar transmitiendo la infección al hospedador vertebrado. En este sentido, aunque la infección del tejido del aparato reproductor ha sido definida por algunos autores (Mellor,

2000), la presencia del virus en la forma larvaria no ha sido demostrada hasta la fecha (Nunamaker y cols., 1990; Takamatsu y cols., 2004).

La presencia de otros géneros de artrópodos, que presenten una mayor actividad en épocas frías y que actúen como vectores biológicos de estas enfermedades es otra de las cuestiones que han sido propuestas (Bowknekt y cols., 2010).

Sin embargo, parece más aceptado que la supervivencia del virus a los periodos disgenésicos se realice en el hospedador vertebrado, donde las hipótesis que lo sustentan son también muy diversas.

Una de las teorías más aceptadas para el *overwintering* es el establecimiento de un prolongado periodo de viremia en los rumiantes (Luedke y cols., 1977; Takamatsu y cols., 2003; Napp y cols., 2011). La máxima duración de la viremia en condiciones experimentales se ha observado en el ganado bovino, siendo en todo caso menor a los 100 días (Sellers y Taylor., 1980). Este periodo de viremia es generalmente más corto que la época de escasa o nula abundancia de culicoides, por lo que la circulación del virus se vería muy disminuida.

Algunos autores plantean la transmisión transplacentaria en los rumiantes como una posible vía de mantenimiento de la circulación del virus en la época

invernal (Gibbs y cols., 1979; Santman-Berends y cols., 2010)

Takamatsu y cols. (2004) proponen un modelo basado en la actuación combinada del vector y los hospedadores vertebrados. Este estudio se centra en la posibilidad de que los linfocitos-T $\gamma\delta$, que *in vitro* permanecen persistentemente infectados por el VLA, se vean seriamente afectados por las proteasas derivadas de la inflamación tras la picadura del artrópodo. Estas enzimas, generadas tras la inflamación en la piel, destruirían la cápsida externa del VLA liberando partículas subvirales consideradas mucho más infecciosas para el vector que el propio virus (Mertens y cols., 1987; Mertens y cols., 1996; Hemati y cols., 2009), por lo que al producirse la picadura, estas partículas podrían ser activadas incluso meses después de la última detección de la viremia.

Otro factor a tener en cuenta podría ser el aumento del comercio y de las exportaciones que mediante las diferentes redes de transporte hacen que la enfermedad emerja o re-emerja en determinadas zonas. En muchas ocasiones como consecuencia del transporte de animales e incluso de vectores infectados, como recientemente ha ocurrido con la enfermedad de Schmallenberg, o la propia LA (EFSA, 2012). De hecho Napp y cols. (2011), muestran el incremento del riesgo de vehiculación de culicoides por transporte marítimo, terrestre y aéreo que se ha venido produciendo en los últimos años. La presencia del vector en

productos vegetales (especialmente flores), animales, o en el mismo vehículo ha sido también descrita y asociada al transporte (EFSA, 2012; Napp y cols., 2013).

2.5. Patogénesis.

La patogenicidad del VLA muestra un patrón muy similar a las infecciones provocadas por otros orbivirus entre los que se incluyen el VEHE o el VPEA, presentando todos ellos un cuadro clínico con disfunciones circulatorias y respiratorias (Murray y Trainer, 1970; Fletch y Karstad., 1971; Hoff y Trainer, 1974; Prestwood y cols., 1974; Pini, 1976; Work y cols., 1992; Russell y cols., 1996; Gómez-Villamandos y cols., 1999; Radostits y cols., 2002; Shwartz-Cornil y cols., 2008). La infección en rumiantes se caracteriza por una viremia más o menos prolongada que puede persistir en presencia de un alto título de anticuerpos neutralizantes, aunque los animales recuperados sean ya inmunes a una nueva infección por ese mismo serotipo (Schwartz-Cornill y cols., 2008).

Por tanto, y dado que la acción patógena del VLA se encuentra muy bien documentada, tomaremos a este virus como referencia en la descripción del ciclo de los orbivirus en el hospedador vertebrado (Fletch y, Karstad, 1971; McLachlan y cols., 2008).

Cuando el virus es inoculado por el vector, alcanza los nódulos linfáticos más cercanos en donde se produce una

primera replicación (Stallknecht y cols., 1997). El virus se disemina vía linfática (Barratt-Boyes y McLachlan, 1994) y sanguínea (Brodie y cols., 1998) asociado a los eritrocitos (Sellers, 1981; Breard y cols., 2004) y alcanza otros tejidos, produciéndose en estos una segunda replicación. El pulmón es considerado como el órgano diana en rumiantes, aunque el virus se replica frecuentemente en el endotelio vascular, endotelio y fagocitos mononucleares del bazo y en otros nódulos linfáticos alejados del lugar de la inoculación (Pini, 1976; Meyrick, 1989; Barratt-Boyes y McLachlan, 1994; McLaughlin y cols., 2003). La presencia del virus también ha sido detectada en otros órganos como en lengua, hígado, riñón o placenta, así como en fluidos como la orina, semen o líquido pleural (Vosdingh y cols., 1968; Sánchez-Cordón y cols., 2010)

El daño a nivel del endotelio vascular supone para el animal afectado el efecto patogénico más importante ya que cursa con hemorragias, infarto tisular, coagulopatías con cuadros de coagulación intravascular diseminada y edema generalizado. La destrucción en las células del endotelio parece ser la causante de estos desórdenes a nivel vascular en la fase aguda de la enfermedad (Russell y cols., 1996; Drew y cols., 2010). Aunque las lesiones vasculares son las causantes de los signos clínicos de la enfermedad (Russell y cols., 1996; McLachlan, 2011), el mecanismo patogénico intrínseco es la inducción de apoptosis y/o necrosis en

células endoteliales microvasculares, monocitos y linfocitos T activados (Mortola y cols., 2004).

Existen estudios que señalan diversas causas acerca de la mayor virulencia del VLA en la especie ovina respecto al resto de especies de rumiantes. Russell y cols. (1996), señalan que esta mayor sensibilidad puede deberse a la mayor cantidad de receptores en las células endoteliales de ovino, o la mayor afinidad de estos hacia el virus. Estos autores apuntan también que en la infección de las células endoteliales en ovinos, la producción de virus y la extensión resulta mayor que en la especie bovina.

Otro dato a tener en cuenta es que en la infección con VLA en rumiantes se produce un aumento plasmático de prostaciclina y tromboxano. La prostaciclina (o prostaglandina I₂) tiene un gran efecto vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria, mientras que el tromboxano es un potente factor de coagulación. En bovino, la proporción prostaciclina/tromboxano es muy superior a 1 lo que, según De Maula (2002), podría explicar la menor sensibilidad de esta especie a la enfermedad debido a su menor propensión a daños vasculares y trombógenos.

La respuesta inmune humoral se basa en la producción de anticuerpos neutralizantes específicos frente a las proteínas de la cápsida externa (Mertens y cols., 1989; Roy y cols., 1990; Lobato y cols., 1997).

La conformación antigénica de la proteína VP2 es la principal responsable de la existencia de distintos serotipos en los orbivirus; por esta razón, los anticuerpos neutralizantes generados por el hospedador sólo lo protegen frente al serotipo homólogo. En algunas ocasiones, si dos serotipos presentan una conformación antigénica parecida de la proteína VP2, se puede establecer una protección cruzada (Jeggo y cols., 1983; Maan y cols., 2007).

Existen otras poblaciones de anticuerpos no neutralizantes que reaccionan frente a la proteína VP7, situada en la parte interna de la cápsida. Ésta proteína presenta baja variabilidad por lo que se utiliza frecuentemente para realizar el reconocimiento entre las diferentes especies de orbivirus, pero no para la diferenciación del serotipo (Collen y cols., 1992; Gandhale y cols., 2011).

En los estudios experimentales realizados en ovino, los principales antígenos inductores de la respuesta celular por parte de los linfocitos T CD8+, fueron las proteínas no estructurales, fundamentalmente la NS-1, y en menor medida las proteínas estructurales VP3, VP7, VP5 y VP2, (Andrew y cols., 1995; Jones y cols., 1996; Janardhana y cols., 1999; Schwartz-Cornil y cols., 2008).

Como ya hemos señalado, los principales determinantes específicos de serotipo se encuentran en la proteína VP2 y algunos en la VP5, mientras que los

determinantes que fijan la especie vírica se encuentran dentro de las proteínas estructurales principales, fundamentalmente la VP7 (Takamatsu y cols., 2003). El reconocimiento de las proteínas previamente expuestas por los linfocitos T CD4 hace que, tras la emisión de citoquinas, acudan los linfocitos B encargados de la producción de anticuerpos específicos frente a esos antígenos (Wade-Evans y cols., 1996). No obstante, la VP7 es inmunodominante para la producción de anticuerpos pero estos no son neutralizantes, por lo que no protegen frente a la infección (Collen y cols., 1992).

2.6. Clínica y lesiones.

La variedad de formas clínicas provocadas por el VLA y el VEHE en los rumiantes es amplia y se producen desde infecciones subclínicas e incluso asintomáticas, hasta enfermedad de curso agudo que puede desembocar en la muerte del animal (OIE, 2009). Ambas enfermedades cursan con un cuadro clínico similar derivado de la acción patógena de ambos virus en sus hospedadores vertebrados.

2.6.1. Clínica y lesiones de la lengua azul.

Las infecciones experimentales realizadas en rumiantes domésticos demuestran que en los animales afectados, tras un periodo de incubación generalmente inferior a 7 días, la temperatura corporal alcanza 41°C, manteniéndose durante 5 ó 6 días. A las 48 horas del

comienzo de la fiebre, se manifiestan otros signos como descarga nasal mucopurulenta en ocasiones acompañada de sangre, salivación de aspecto espumoso y enrojecimiento de las mucosas nasal y oral. Desde las primeras horas post-infección los animales suelen presentar apatía, depresión e inapetencia (Schwartz-Cornil y cols., 2008; Dal Pozzo y cols., 2009; Hamers y cols., 2009;).

La lengua puede presentar una coloración cianótica, signo que da nombre a la enfermedad, pero no suele ser un signo frecuente en la infección natural. Es corriente observar gingivitis y glositis, así como queilitis acompañada a veces de fasciculaciones (Radostits y cols., 2012). Son muy comunes las úlceras necróticas en las zonas laterales de la lengua, así como hiperemia y ulceraciones en las comisuras labiales y alrededor del ano y vulva (Hambiln y cols., 1998; Schwartz-Cornil y cols., 2008). La aparición de edema submandibular, cefálico, torácico y abdominal también se presenta de manera habitual. El edema a nivel torácico puede provocar dificultades respiratorias.

La respiración, tiende a ser estertórica, presentando una marcada taquipnea en la que se pueden rebasar las 100 respiraciones por minuto, derivadas de la efusión pleural y pericárdica. La diarrea y la disentería también se producen con frecuencia. Del mismo modo, la dificultad y lentitud en el desplazamiento debido a las alteraciones del rodete coronario que provocan cojeras, son también generalmente

apreciables (Hambiln y cols., 1998; Radostits y cols., 2002; Allepuz y cols., 2010; Schwartz-Cornil y cols., 2008).

La presencia de abortos, nacidos muertos o débiles, e incluso malformaciones en los recién nacidos, también se han descrito en hembras gestantes infectadas por el VLA (Nusinovici y cols., 2012).

En los brotes descritos en Andalucía (Allepuz y cols., 2010) en ovino, los principales signos incluyeron descarga nasal, edema facial, fiebre, cansancio, apatía, disnea y cojeras (Fig. RB3).

Las infecciones experimentales realizadas en ciervo y cabra montés con algunos de los serotipos circulantes en España, VLA-1 y VLA-8, han demostrado la ausencia de signos clínicos o lesiones en estas especies (López-Olvera y cols., 2010; Lorca-Oró, 2012a; Lorca-Oró, 2012b). Excepto en muflón (Fernández-Pacheco y cols., 2008), no existen evidencias de clínica de la enfermedad en estudios de campo realizados en estas y otras especies de ungulados silvestres en España (Ruiz-Fons y cols., 2008; García y cols., 2009; Rodríguez-Sánchez y cols., 2010).



Figura RB3.- Frecuencia de signos clínicos y lesiones en el brote de VLA-1 en Andalucía según Allepuz y cols., 2010

Sin embargo, estudios llevados a cabo en ciervo de cola blanca infectados natural o experimentalmente demuestran que la infección por los serotipos VLA-1, VLA-8 y VLA-17 suelen provocar enfermedad aparente y casos de mortalidad. Los signos clínicos más frecuentes incluyeron una acusada depresión, debilidad, fiebre, anorexia y pérdida de peso, aunque también se ha descrito ptialismo, secreción nasal mucopurulenta, diarrea sanguinolenta o una grave disnea. La isoleucopenia y neutropenia son los principales cambios hematológicos observados en esta especie (Vosdingh y cols., 1968; Hoff y cols., 1974; Prestwood y cols., 1974).

El cadáver suele estar cianótico, aunque en buen

estado de carnes, siendo evidentes todas las lesiones que aparecían en el animal vivo, como la congestión y úlceras en todas las mucosas (boca, nariz, ano, vulva...) (Hambiln y cols., 1998; Schwartz-Cornil y cols., 2008; Radostits y cols., 2012).

La necrosis del músculo esquelético y cardiaco resulta muy habitual, pero la hemorragia en la base de la arteria pulmonar es una lesión patognomónica de la LA que permite orientar de una manera muy precisa el diagnóstico (Radostits y cols., 2002). Las dermatitis en las zonas interdigitales resultan también frecuentes, así como la inflamación del rodete coronario y laminitis.

El muflón presenta un cuadro con lesiones similares a las de la oveja doméstica. En el sur de España se han diagnosticado casos del VLA-1 en muflones, que cursaron con inflamación de las membranas mucosas, congestión, hinchazón y hemorragias a nivel vascular (Fernández-Pacheco y cols., 2008). En esta misma zona, dos muflones encontrados muertos, positivos a VLA-4, presentaron diferentes lesiones incluyendo edema alveolar, hemorragia difusa en el miocardio, arteria pulmonar y músculo estriado de la lengua, así como congestión y hemorragias hepáticas (Rodríguez-Sánchez y cols., 2010).

Las lesiones descritas en ciervos de cola blanca están relacionadas con las alteraciones cardiovasculares, como hemorragias generalizadas que se manifiestan con la aparición de petequias multifocales en la piel y mucosas. Se

pueden producir también sufusiones hemorrágicas en la musculatura esquelética y cardíaca, afectando a los músculos papilares del ventrículo izquierdo, base de la aorta y de la arteria pulmonar, también a nivel pericárdico y subpericárdico, en tráquea y en el tracto digestivo (Vosdingh y cols., 1968; Hoff y cols., 1974; Prestwood y cols., 1974; Howerth y Tailer, 1988; Quist y cols., 1997; Howerth y cols., 2001). En rumen y abomaso se pueden observar ulceraciones y desprendimiento de la mucosa, produciéndose enteritis y gastritis.

Son frecuentes también la laminitis, la ulceración y costras en las fosas nasales y mucosa oral, afectando a la almohadilla dental, las encías, el paladar y la lengua (Prestwood y cols., 1974; Howerth y cols., 2001). Los edemas, que en general se distribuyen por las zonas declives del cuerpo, como la zona submandibular y cefálica y las partes ventrales del tórax y el abdomen. También se ha descrito la inflamación de la lengua (Hoff y cols., 1974; Prestwood y cols., 1974).

En ciervo mulo infectado experimentalmente, la enfermedad cursa con signos leves pudiendo presentarse una ligera hipertermia (Work y cols., 1992).

En el berrendo norteamericano son frecuentes las hemorragias en pulmones y arteria pulmonar, así como en tracto digestivo, edemas en tráquea, pulmón, en zonas ventrales y lesiones en las patas. También se han descrito

necrosis fibrinosa arterial, depleción linfoide en el bazo y necrosis neuronal (Thorne y cols., 1988).

2.6.2. Clínica y lesiones de la enfermedad hemorrágica epizoótica.

Los signos clínicos de la enfermedad hemorrágica epizoótica han sido ampliamente descritos en ciervo de cola blanca y ganado bovino, pero en menor medida en otras especies de rumiantes domésticos o silvestres. Según Savini y cols. (2011) la clínica descrita en el ciervo de cola blanca incluyen al menos tres formas de presentación: sobreaguda, aguda y crónica.

En la forma sobreaguda los animales mueren rápidamente, entre las 8 y las 36 horas, con escasos signos clínicos, mientras que en la forma aguda los ciervos suelen morir unos días después de presentarse los primeros signos (Nol y cols., 2010; Ruder y cols., 2012); en ambos casos la mortalidad suele ser muy alta. La forma crónica, por su parte, puede extenderse durante varias semanas con tasas de supervivencia frecuentemente más elevadas (Savini y cols., 2011).

Las formas aguda y sobreaguda, cursan con signos muy similares, presentando anorexia, debilidad, dificultad respiratoria, edema cefálico y cervical, fiebre alta, salivación excesiva y descarga nasal (Nol y cols., 2010; Ruder y cols., 2012). La inflamación de la lengua y la conjuntiva también

puede presentarse frecuentemente, así como la diátesis hemorrágica y la diarrea sanguinolenta. La hematuria y la deshidratación son usuales en los últimos estadios de la enfermedad (Savini y cols., 2011).

En el caso de los rumiantes domésticos la enfermedad ha estado tradicionalmente relacionada con el ganado bovino y muy asociada a determinados serotipos, como la cepa 318 del VEHE-6 y el subtipo del VEHE-2 causante de la enfermedad de Ibaraki. Los signos descritos incluyeron descarga nasal y ocular mucopurulenta, salivación excesiva, enrojecimiento de la mucosa oronasal, cianosis y dificultades en la deglución. Como signos a nivel general se describieron la deshidratación, fiebre, debilidad, anorexia, cojera y rigidez en los movimientos (Inaba, 1975; Yadin y cols., 2008; Temizel y cols., 2009; Kedimi y cols., 2010). También son frecuentes los abortos, malformaciones fetales y animales nacidos muertos (Ohashi y cols., 1999), recordando a la enfermedad de Schmollenberg. En general la enfermedad se asocia a pérdidas de producción, sobre todo en bovino de aptitud lechera.

En las formas agudas y sobreagudas de la EHE se han descrito, como lesiones más frecuentemente encontradas en ciervo de cola blanca, la hiperemia, úlceras y erosiones de la mucosa de la cavidad oral, lengua, almohadilla dental, paladar, rumen y abomaso; también se define como lesión usual la hiperemia conjuntival. Los animales que manifiestan

formas agudas desarrollan hemorragias petequiales en piel, corazón y tracto gastrointestinal. La necrosis son frecuentes especialmente en las glándulas salivales, la lengua, las paredes de la aorta y el músculo papilar del ventrículo izquierdo del miocardio (Nol y cols., 2010; Ruder y cols., 2012).

En la forma crónica, resulta frecuente encontrar úlceras en las diferentes mucosas del aparato digestivo (boca, esófago y en el rumen). También los animales suelen sufrir lesiones en las zonas de la pezuña y la pata, siendo frecuentes la presencia corinitis y laminitis. Las lesiones histopatológicas pueden incluir vasculitis generalizada, trombosis, inflamación endotelial, hemorragias y cambios degenerativos y necrosis en muchos órganos (Nol y cols., 2010; Ruder y cols., 2012).

En estudios realizados en el carnero de las Rocosas se ha evidenciado un extenso edema subcutáneo, así como hidrotórax e hidropericardio, secreción vercosa de la nariz y de la sangre alrededor del ano. También se han encontrado hemorragias multifocales en el epicardio y en el músculo papilar (Noon y cols., 2002a, b).

En bovino resultan frecuentes la blefaritis, erosiones de la lengua, estomatitis y descamación de la mucosa oronasal. También se ha observado eritema en la ubre y frecuentemente edema, hemorragias, erosiones y ulceraciones alrededor de la pezuña (Yadin y cols., 2008;

Kedimi y cols., 2010). Se han descrito neumonías por aspiración como consecuencia del daño en los músculos estriados encargados de la deglución, describiéndose en estos su necrosis y mineralización (Inaba, 1975).

2.7. Diagnóstico.

El diagnóstico presuntivo de la LA y la EHE puede realizarse atendiendo diversos criterios clínicos, lesionales y epidemiológicos descritos en anteriores apartados. No obstante pueden existir una serie de enfermedades que presenten similitudes y por supuesto analogías entre ambas enfermedades (OIE, 2009).

El diagnóstico directo se basa en la detección del agente o de alguna de sus estructuras y se basan fundamentalmente en el aislamiento vírico y en la detección de ARN vírico específico mediante técnicas moleculares.

El aislamiento de los orbivirus permite diagnosticar la presencia activa del virus en el hospedador. Para el aislamiento pueden emplearse diferentes métodos como son la inoculación intravascular en huevo embrionado, las inoculación experimental en ovino, o la inoculación sobre líneas celulares, como la BHK-21 o la KC (una línea celular obtenida de larvas de *C. variipennis*) (OIE, 2009). Para identificar el posible virus aislado se recurre a la detección específica de su ARN mediante técnicas moleculares.

Las muestras recomendadas para realizar la

inoculación deben proceder de tejido sanguíneo o esplénico, siendo menos recomendable la utilización de linfonodos, médula ósea, hígado, pulmón o semen (Vosdingh y cols., 1968; OIE, 2009; Afshar, 1994; Hamblin y cols., 1998; Sánchez-Cordón y cols., 2010).

En el ganado ovino y bovino, el virus resulta viable para su aislamiento en la sangre desde el primer día post-inoculación (dpi) hasta como máximo los 49-60 dpi (Barratt-Boyes y McLachlan, 1994; Bonneau y cols., 2002).

Los resultados obtenidos mediante infecciones experimentales en ciervos de la península ibérica indican que es posible el aislamiento desde el primer dpi hasta, al menos, el 112 dpi (López-Olvera y cols., 2010). En el mismo sentido, los resultados obtenidos por Lorca-Oró y cols. (2012) confirman el aislamiento del VLA en esta especie desde el primer dpi hasta, al menos, el 26 dpi (día de conclusión del estudio). En cabra montés, especie autóctona de la península Ibérica, el VLA pudo ser aislado desde los 2 hasta los 28 dpi en el que concluyó la experiencia (Lorca-Oró y cols., 2012).

El VLA ha sido aislado desde el 1º hasta el 10º dpi en ciervo mulo, entre el 2º y el 8º dpi en el ciervo de cola blanca y entre el 4º y el 28º dpi en el bisonte americano (Vosdingh y cols., 1968; Hoff y Trainer, 1974; Work y cols. 1992; Tessaro y Clavijo, 2001).

En un experimento llevado a cabo por Murray y Trainer (1970) en wapitíes, consiguieron demostrar el aislamiento entre el 2º y el 10º dpi; sin embargo, el virus pudo ser aislado nuevamente al 106º dpi ya que consiguieron reactivar la viremia tras la administración de corticoides durante 2 días. Esto indica, para estos autores, que aunque ni el aislamiento ni la detección del ARN del virus fuera posible, algunas cepas del VLA pueden mantenerse latentes en el hospedador durante un tiempo no determinado.

En el caso del VEHE la duración de la viremia ha sido descrita en cérvidos y bovinos tras la realización de las infecciones experimentales. En el ciervo de cola blanca infectado con VEHE-2, el agente pudo ser aislado desde los 2 dpi en algunos individuos, presentándose viremia en todos los animales en el 4º dpi. El aislamiento del agente ha podido ser realizado posteriormente a los 50 dpi, aunque generalmente resulta muy complicado más allá de los 25 dpi (Quisty cols, 1997; Gaydos y cols., 2002).

El uso de técnicas moleculares para la detección del ARN vírico es probablemente uno de los métodos más empleados para el diagnóstico, tanto del VLA como del VEHE. Las muestras de elección serán las mismas que se han descrito para realizar el aislamiento, e incluso podrían usarse células ya infectadas.

La RT-PCR permite identificar la especie de orbivirus

mediante el uso de los cebadores o *primers*, cortas secuencias de ARN que sirven para iniciar la replicación de la cadena. Para conseguir una alta especificidad y sensibilidad se utilizan segmentos con regiones altamente conservadas dentro de cada especie, que en los orbivirus suelen describirse en los SEG-1, SEG-5 y SEG-9 (Mertens y cols., 2007; Touissant y cols., 2007; Wilson y cols., 2009). En cambio, para realizar el diagnóstico del serotipo vírico se utilizan *primers* con secuencias generalmente integradas en el SEG-2 (Agüero y cols., 2008a; Hoffmann y cols., 2009).

Algunos estudios llevados a cabo con el VLA, indican que el periodo de detección del virus, viene definido por la asociación del virus a los eritrocitos, que se produce poco tiempo (unas 24 horas) después de producirse la infección. El virus se localiza en las vesículas intracelulares de los glóbulos rojos (Whether y cols., 1989; Brewer y McLachlan, 1994).

La presencia de ARN del VLA, ha podido ser detectada hasta el 222º dpi en ovino y el 180º dpi en bovino (Katz y cols., 1994; Bonnaeu y cols., 2002).

Por otro lado, la secuenciación del genoma del virus se ha revelado en los últimos años como una herramienta muy útil para llevar a cabo el seguimiento y la evolución genética de los virus (Barros y cols., 2007; Cêtre-Sossah y cols., 2010). Mediante el uso de uno o varios *primers* específicos es posible desarrollar toda la longitud de un segmento concreto del genoma. Generalmente, en los orbivirus, algunos

segmentos de elevada variabilidad (SEG-2, SEG-7, SEG-10) suelen ser usados para llevar a cabo análisis de epidemiología molecular que permitan conocer la procedencia y los cambios evolutivos o recombinaciones frecuentemente observados en este género (Barros y cols., 2007; Maan y cols., 2007; Cêtre-Sossah y cols., 2010).

Concretamente el SEG-10, ha sido uno de los más utilizados debido a su corto tamaño (entre 810-820 pb) y elevada variabilidad, siendo considerado como el más variable de los que codifican proteínas no estructurales. Así, se ha sugerido que las mutaciones en el SEG-10, que afectan a la conformación de la proteína NS3, pueden estar relacionadas con la transmisión del virus por diferentes poblaciones de insectos vectores y especies (Bonneau y cols., 1999; Nikolakaki y cols., 2005; Wilson y cols., 2007; Balasuriya y cols., 2008).

La secuenciación genética de los VLA ha permitido el descubrimiento de nuevos serotipos; así, en el año 2008 se identificó el orbivirus de Toggenburg, también denominado VLA-25, consecuencia de la declaración de un brote con signos similares a los de LA en caprinos del Cantón de Sankt Gallen, en el noreste en Suiza. Los análisis llevados a cabo usando los SEG-2, SEG-7 y SEG-10 demostraron diferencias significativas con los conocidos hasta la fecha (Hoffmann y cols, 2008b). Este mismo procedimiento fue empleado para la identificación del VLA-26 en Kuwait en el año 2010, que

provocó mortalidad y signos compatibles con LA en ganado caprino y ovino de esta zona (Maan y cols., 2011).

Del mismo modo, en los primeros estudios sobre la enfermedad de Ibaraki o sobre el VEHE-318, no se relacionaron con el VEHE, pero análisis genéticos demostraron posteriormente que se trataban de diferentes cepas del VEHE-2 (Mertens y cols., 2005; Allison y cols., 2010). Precisamente, la divergencia genética de estos dos virus con otros VEHE en la proteína VP2 aumenta considerablemente las diferencias serológicas existentes entre ellos complicando así el diagnóstico mediante serología (Ohashi y cols., 2002; Mertens y cols., 2005).

Otros métodos de detección del agente, aunque no tan extendidos pueden ser las pruebas ELISA de captura de antígeno y las técnicas inmunohistoquímicas (inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa).

Las técnicas indirectas de diagnóstico se basan en las pruebas serológicas, pruebas de detección de anticuerpos específicos que se encuentran ampliamente difundidas y presentan unos buenos niveles de sensibilidad y especificidad, siendo reconocidas como aptas para realizar el diagnóstico oficial en ambas enfermedades.

En general la duración de la respuesta humoral se considera elevada, siendo frecuentemente superior a un año, aunque la técnica empleada influye decisivamente en

detecciones más precoces o tardías dependiendo de su sensibilidad (Stott y cols., 1985; Dal Pozzo y cols., 2009; Hamers y cols., 2009).

La detección de anticuerpos frente al VLA en ovinos y bovinos puede realizarse a partir de los 7-11 dpi (Richards y cols., 1988; De la Concha-Bermejillo y cols., 1993; Dal Pozzo y cols., 2009) y en los camélidos alrededor de los 7 dpi (Batten y cols., 2011). La fase de meseta puede mantenerse incluso hasta un año en ovinos vacunados (Hamers y cols., 2009; Calistri y cols., 2010).

Las infecciones experimentales realizadas en especies silvestres, como el ciervo rojo, demuestran la presencia de anticuerpos alrededor de los 7-8 dpi, situándose el clímax alrededor de los 17 dpi. Tras alcanzar este pico, los títulos disminuyen ligeramente para mantenerse en una fase de meseta con títulos detectables al menos hasta los 112 dpi (López-Olvera y cols., 2010; Lorca-Oró y cols., 2012a).

En cabras monteses experimentalmente infectadas se ha podido detectar la presencia de anticuerpos frente al VLA desde los 7 hasta los 28 dpi (Lorca-Oró y cols., 2012b), aunque algunos individuos vacunados y chequeados periódicamente frente al VLA han mostrado anticuerpos incluso hasta 24 meses después de la vacunación (Lorca-Oró, comunicación personal).

En el ciervo de cola negra, los resultados obtenidos

son similares, evidenciándose anticuerpos desde los 6 dpi hasta los 692 dpi (Work y cols., 1992). En otras especies norteamericanas como el wapití o el bisonte, es posible la detección desde el 2º hasta el 5º y el 11º dpi, respectivamente (Murray y Trainer, 1970; Tessaro y Clavijo, 2001).

En cuanto a la EHE, la primera detección de anticuerpos en bovino se sitúa en torno a los 10 dpi, siendo su persistencia superior a los 100 dpi (Gibbs y Lawman, 1977; Eschbaumer y cols., 2011). En rumiantes silvestres, las infecciones experimentales realizadas en ciervo de cola blanca demuestran la presencia de anticuerpos a los 10 dpi (Quist y cols., 1997; Ruder y cols., 2012) y Gaydos y cols., (2002), describen la persistencia de anticuerpos hasta los 73 dpi en el que los animales fueron sacrificados. En wapitíes, la presencia de anticuerpos ha sido evidenciada desde los 13 dpi hasta los 170 dpi (Hoff y Trainer, 1973). Finalmente, en los cérvidos europeos se detectó la presencia de anticuerpos desde los 10 dpi (Gibbs y Lawman, 1977).

Las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) están ampliamente extendidas para el diagnóstico serológico de numerosas enfermedades y, en el caso de la LA y la EHE, son procedimientos diagnósticos internacionalmente aprobados (OIE, 2009). Las pruebas ELISA específicas para la detección de anticuerpos están basadas en su mayoría en el reconocimiento de la proteína antigénica VP7, que es

inmunodominante durante la producción de anticuerpos (Hübschle y cols., 1981).

La sensibilidad de las técnicas ELISA suele ser elevada, siendo útil para llevar a cabo un *screening* serológico en las especies domésticas. Aunque la especificidad a nivel de especie se mantiene en niveles elevados, algunos falsos positivos son frecuentemente encontrados, por lo que a menudo se hace necesario confirmar con el uso de otras técnicas serológicas (Patton y cols., 1994; Afshar, 1994; Singer y cols., 1998).

Dada la gran cantidad de serotipos existentes y la elevada variabilidad genética incluso dentro de los mismos, el desarrollo de ELISA para la detección de anticuerpos específicos de serotipo resulta poco operativa debido a la baja especificidad que presentan (Du Plessis y cols., 1992).

Por su parte, la seroneutralización vírica (SNV) es una de las pruebas reconocidas por la OIE para la detección de anticuerpos frente al VLA o al VEHE debido a su elevada especificidad, siendo de gran utilidad para la detección del serotipo del virus. Sin embargo, un porcentaje de los sueros no puede ser analizado debido a problemas de citotoxicidad. Este hecho resulta de importancia en fauna silvestre debido al estado que en muchas ocasiones presentan los sueros en animales cazados o encontrados muertos en el medio (Singer y cols., 1998; OIE, 2009).

Otros métodos de diagnóstico serológico empleados son la prueba de fijación del complemento y la inmunodifusión en gel de ágar (Afshar y cols., 1989; Afshar, 1994; Patton y cols., 1994; Singer y cols., 1998; Velic y cols., 2004; Shimizu y cols., 2004), mientras que para la identificación del serotipo se emplean la inhibición en placa, neutralización de microtítulos y el test de inhibición de la fluorescencia (Afshar, 1994; OIE, 2009).

2.8. Medidas de lucha.

Las medidas de control que se realizan, tanto para la LA como para la EHE, son parecidas dada la similitud de sus epidemiologías. Generalmente, cuando alguna de estas enfermedades se ha establecido en una determinada zona, su erradicación resulta altamente complicada. Este hecho se debe principalmente a la dificultad que entraña el control del vector, a lo que se suma la gran variedad de especies de hospedadores vertebrados, muchos de ellos de vida libre, que pueden actuar manteniendo la circulación del virus en la zona (Saegerman, 2007).

En España, las medidas de control implementadas sobre el ganado doméstico quedan reflejadas en el programa de erradicación de la LA desarrollado desde octubre de 2004 hasta junio de 2011. Las principales medidas consisten en la notificación de los casos sospechosos, restricción de movimientos, vacunación de animales susceptibles y el sacrificio de animales infectados

(Real Decreto 1228/2001, de 8 de noviembre, por el que se establecen medidas específicas de lucha y erradicación de la lengua azul).

Tras la notificación de un caso positivo, se establecerán dos áreas, una de protección, de 100 Km de radio alrededor de la explotación positiva donde se controlará la evolución de la enfermedad, y un área de vigilancia, de 50 Km. de radio. Las explotaciones afectadas quedan sometidas a la restricción de movimientos: sus animales no pueden ser transportados a zonas fuera del área de vigilancia (MAGRAMA, 2013).

La vacunación ha sido otra de las principales medidas de control en los países europeos para disminuir progresivamente la circulación del virus (Saegerman y cols., 2007; Arenas y cols., 2008; Zientara y cols., 2010).

Las vacunas utilizadas pueden ser vivas atenuadas o inactivadas. Las primeras se basan en la atenuación de la virulencia mediante pases sucesivos en cultivos celulares, generalmente. Estas vacunas fueron usadas durante el brote provocado por VLA-4 durante los años 2004 y 2005, siendo de gran utilidad para el control. Se recomienda su uso realizando la vacunación en época de baja actividad del vector con revacunación al año siguiente (EFSA, 2007).

La ventaja de este tipo de vacunas es que suelen ser baratas, fáciles de desarrollar y presentan una elevada

efectividad (Scott y cols., 1987; Hamers y cols., 2009). Por el contrario, como inconvenientes se describen la viremia postvacunal, la posible reversión hacia virulencia, la posibilidad de recombinación entre segmentos de las vacunas con virus circulantes y la aparición de trastornos reproductivos en animales vacunados (Samal y cols., 1987; Flanagan y Johnson, 1995; Dungu y cols., 2004; Veronesi y cols., 2005). Por estos motivos la UE ha limitado su utilización, excepto en lugares donde no exista otras posibilidades de control (EFSA, 2007).

Por su parte, las vacunas inactivadas se fundamentan en la inactivación del virus por medios químicos o físicos, conservándose su estructura antigénica. Se comenzaron a utilizar para el control del VLA-4 en España a partir de 2005, y también fueron usadas en los brotes de VLA-1 y VLA-8. Su pauta es diferente dependiendo del fabricante; los bovinos deben ser revacunados al mes siguiente de la primera dosis, mientras que en los pequeños rumiantes este periodo es entre uno y tres meses (MAGRAMA, 2008). Este tipo de vacunas inactivadas se ha mostrado muy efectivo para el control de brotes de LA (Saegerman y cols., 2007).

Recientemente, algunas investigaciones han puesto de manifiesto que la vacunación en ciervo rojo y cabra montés con vacunas inactivadas para los serotipos 1 y 8, resulta efectiva en la misma medida que en los animales domésticos. Los animales a los que se les administró una sola

dosis adquirieron inmunidad durante un largo periodo, aumentando esta con una revacunación. No se apreciaron signos clínicos de importancia en los animales vacunados y posteriormente desafiados (Lorca-Oró y cols., 2012a; Lorca-Oró y cols., 2012b).

La administración de tratamientos paliativos individuales pueden usarse en animales especialmente valiosos, sin embargo no presenta influencia en la epidemiología de estas enfermedades.

Por otro lado, el uso de productos insecticidas (adulticidas y larvicidas) también puede ser usado como medio para prevenir la transmisión; los adulticidas suelen usarse directamente aplicándolos sobre los animales para evitar la picadura, mientras que los larvicidas son frecuentemente usados sobre las instalaciones e incluso en aquellas zonas que los animales suelen frecuentar (EFSA, 2007).

Del mismo modo, el secuestro o estabulación de animales en las horas de máxima actividad del vector suelen ser acciones útiles, ya que disminuyen el riesgo de contacto entre los hospedadores vertebrados e invertebrados. La retirada del estiércol y el control de zonas húmedas artificiales lejos del establo son medidas también eficaces (EFSA, 2007; Saegerman, 2007; Arenas y cols., 2008, MAGRAMA, 2012).

Sin embargo, el control de las arbovirosis en poblaciones silvestres resulta siempre complicado, como se ha evidenciado en los últimos años tras los diferentes brotes del VLA. Los factores que determinan esta complejidad son derivados de la dificultad para el acceso y manejo de las poblaciones de vida libre (Arenas y cols., 2008), así como del limitado conocimiento existente de la epidemiología de las arbovirosis en estas especies.

Considerando estos factores limitantes, se hace necesario un estudio pormenorizado de la epidemiología de la LA y la EHE con objeto de definir algunas medidas que puedan ser implementadas de forma efectiva en estas especies.

3. Objectives/Objetivos

Objectives

The main objective was to determine the different factors involved in the epidemiology of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in Mediterranean ecosystems of Southern Spain.

To achieve this objective we have designed the following specific objectives:

- To determine the prevalence and spatio-temporal distribution of BTV in wild ruminant in Andalusia by performing serological and virological study.
- To perform a serological survey to detect the possible circulation of EHDV in wild cervid populations in Andalusia.
- To identify the main risk factors potentially involved in the epidemiology of BTV in wild ruminant species in Andalusia.
- To establish a predictive model for the BT in free-living wild ruminants in Mediterranean ecosystems of Southern Spain, which will allows the design of a control program against this disease.
- Describe the spatio-temporal distribution and abundance of Culicoides species present in Andalusia.

Objetivos

El objetivo general de la presente tesis fue evaluar diferentes factores que intervienen en la epidemiología de la lengua azul y la enfermedad hemorrágica epizoótica en los ecosistemas mediterráneos del sur de la península ibérica.

Para la consecución de dicho objetivo se han desarrollado los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la prevalencia y distribución espacio-temporal del VLA en las especies de rumiantes silvestres en Andalucía, mediante la realización de un estudio serológico y virológico.
- Realizar un estudio serológico para detectar la posible circulación del VEHE en las poblaciones de cérvidos silvestres en Andalucía.
- Determinar los principales factores de riesgo potencialmente implicados en la epidemiología del VLA en las especies de rumiantes silvestres en Andalucía.
- Establecer un modelo predictivo para la LA en rumiantes silvestres de vida libre en los ecosistemas mediterráneos del sur de España, que permita llevar a cabo, en su caso, un programa de lucha frente a la enfermedad.
- Describir la distribución espacio-temporal y abundancia de las especies de culicoides presentes en Andalucía.

4. Material y métodos

4.1. Diseño del estudio

El estudio se llevó a cabo en la Comunidad Autónoma de Andalucía, territorio que ocupa una extensión de 87.268 Km², y que se sitúa en la zona sur de la Península ibérica (36º 00' N a 38º 44' N y 1º 37' W a 7º 31' W de latitud). Durante el quinquenio correspondiente a las temporadas de caza 2006/2007 a 2010/2011 se realizó un muestreo en diferentes especies de rumiantes silvestres presentes en los ecosistemas mediterráneos del sur de España, incluyendo las especies cabra montés, ciervo, corzo, gamo y muflón.

Junto a las muestras tomadas en campo, fueron recogidos datos individuales de los animales y de los cotos.

Las muestras positivas al VLA por RT-PCR procedentes de rumiantes domésticos y silvestres fueron cedidas por la CAPMA. Del mismo modo, los resultados de las capturas de culicoides entre agosto de 2007 y octubre de 2011, también nos fueron facilitados por la Administración autonómica.

4.1.1. Determinación del tamaño de la muestra

En nuestro estudio nos hemos propuesto, entre otros objetivos, determinar la prevalencia de infección o proporción de individuos positivos a alguna de las dos virosis estudiadas en relación al total de la población de especies

silvestres susceptibles presentes en Andalucía; para ello, debemos determinar el tamaño de la muestra (para estimar una proporción) necesario para que las prevalencias halladas en la misma sean significativas a nivel de toda la población.

Debemos considerar cuatro factores: la prevalencia que esperamos hallar, el tamaño total de la población, la precisión o error admitido (que es la máxima desviación que estemos dispuesto a aceptar entre el valor de prevalencia obtenido en la muestra y el valor real de la población), y el nivel de confianza; así pues, el tamaño de la muestra (n) podemos calcularlo como:

$$n = \frac{z_{\alpha}^2 \times p \times q}{B^2}$$

Donde n es el tamaño de la muestra, z_{α} es el valor de la *t de Student* para un nivel de confianza determinado, p es la prevalencia esperada, q es 1-p, y B es el error aceptado.

Pero, cuando el tamaño de la población (N) es pequeño (menor de 1000 individuos), es posible obtener un tamaño de muestra mayor que el tamaño de la población ($n > N$), por lo que se debe hacer una corrección para obtener un tamaño de muestra corregido (n_a). En este caso:

$$\frac{1}{n_a} = \frac{1}{n} + \frac{1}{N}$$

No obstante, el cálculo del tamaño de la población en especies silvestres es enormemente complicado por obvias

razones; es habitual calcular estimas poblacionales basadas en el recuento de animales a lo largo de transectos y otros sistemas de estimas. Por este motivo, la mayoría de las veces resulta muy complicado contar con datos fiables de estimas o densidades de animales en una zona. En algunos cotos existen datos de estimas realizadas con métodos más o menos seguros, así como estudios de densidades en determinadas zonas. No obstante, se ha considerado que el número de rumiantes salvajes, de todas las especies, en la zona de estudio es superior a los 1.000 individuos, por lo que las consideraremos como poblaciones infinitas.

Dadas las dificultades de la toma de muestra en estas especies y de la inconstante disponibilidad de ellas en la mayoría de las ocasiones, se optó por tomar todas las muestras posibles de manera aleatoria; cuando el número de individuos en una cacería fue muy elevado, se seleccionaron entre 10 y 15 ejemplares de cada especie.

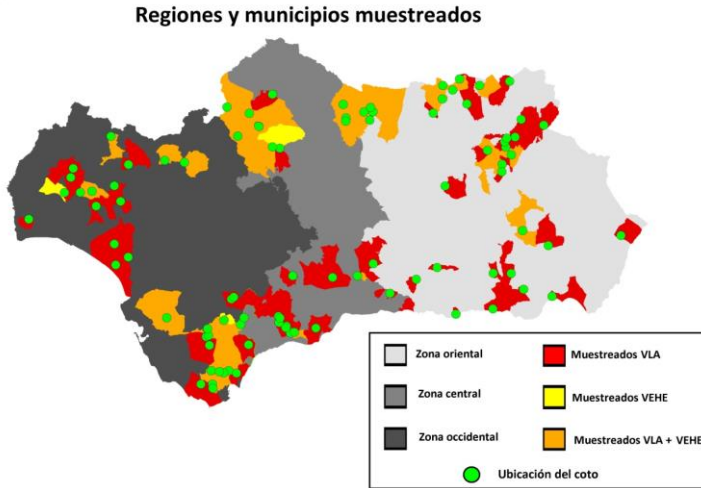
Una vez recogidas todas las muestras posibles y tras el cálculo de las prevalencias muestrales, se concluyó que lo mejor era estimar el error que podíamos haber cometido en el cálculo de la prevalencias en el total de la población.

Para ello establecimos una prevalencia esperada del 50% (*worst acceptable*) y un nivel de confianza del 95%. A partir de estos criterios, aplicamos la fórmula expresada anteriormente pero calculando, en este caso, el error (B):

$$B = Z_{\alpha} \times \frac{\sqrt{p \times q}}{\sqrt{n}}$$

4.2. Obtención de muestras para análisis laboratoriales

Las muestras empleadas en el estudio fueron tomadas directamente de rumiantes salvajes abatidos durante la actividad cinegética o bien de aquellos individuos vivos confinados en centros de referencia o capturados con fines de repoblación. En total 102 cotos fueron muestreados en Andalucía durante el periodo de estudio (Mapa M1)



Mapa M1. Cotos muestreados en Andalucía durante el periodo 2006-2012

Se obtuvieron 2.575 muestras de suero para la realización los análisis serológicos: 770 de cabra montés, 1.227 de ciervo, 150 de corzo, 296 de gamo y 132 de muflón. Del total de muestras de suero recogidas, 2.264 fueron analizadas para la detección de anticuerpos frente al VLA y 798 frente al VEHE. Para llevar a cabo los análisis moleculares se emplearon un total de 1.466 muestras (571 de sangre y 895 de bazo): 380 de cabra montés, 729 de ciervo, 75 de corzo, 177 de gamo y 105 de muflón (tabla M1).

Especies	Análisis serológico VLA	Análisis serológico VEHE	Análisis molecular VLA
Cabra montés	770	-	380
Ciervo	1009	526	729
Corzo	150	58	75
Gamo	211	214	177
Muflón	124	-	105
Bovino	-	-	-
Caprino	-	-	-
Ovino	-	-	-
Total	2264	798	1466

Tabla M1. Número de muestras y análisis realizados

De todas ellas, un total de 1.633 muestras de suero y 932 muestras de tejidos pertenecientes a rumiantes salvajes fueron cedidas por la CAPMA y pertenecen al programa de vigilancia epidemiológica de la LA llevado a cabo en Andalucía.

4.2.1. Muestras de suero.

Las muestras de sangre de los rumiantes salvajes abatidos fueron extraídas mediante punción del seno cavernoso de la duramadre, accediendo por el ángulo medial del ojo o directamente de la cavidad torácica (Arenas-Montes y cols., 2013). En individuos vivos las muestras de sangre fueron extraídas mediante punción de la vena yugular. La sangre obtenida fue depositada en tubos estériles de 10 ml. (Deltalab Eurotubo® 16x100 poliestireno) y transportada en condiciones de refrigeración hasta el laboratorio.

Los tubos con la muestra de sangre fueron centrifugados durante 10 minutos a 400 *g* (Centrifuge 5415D Eppendorf). El suero sobrenadante fue aspirado con pipetas Pasteur y dispensado en tubos tipo Eppendorf de 2 ml. Finalmente la muestra se congeló a -20°C, hasta la realización de los análisis serológicos.

4.2.2. Muestras de tejido.

Las muestras de bazo fueron tomadas de animales cazados y almacenadas en botes estériles de 40 ml. (Deltalab

Eurotubo® 40 ml screwcap containers 30x70 mm). Las muestras de tejido fueron transportadas en refrigeración al laboratorio donde fueron procesadas en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar tipo BSII.

En los individuos en cautividad o capturados se obtuvo una muestra de sangre mediante venipunción yugular; la sangre obtenida fue dispensada en tubos estériles con anticoagulante (Deltalab Eurotubo® blood-plasma EDTA tubes). Las muestras fueron almacenadas en tubos Eppendorf sin ARNasas (Axygen® 0.5mL Flat Cap PCR Tube), realizándose dos alícuotas de 0,5 ml., de cada una.

La superficie de las muestras de bazo fue esterilizada sumergiendo la parte externa en alcohol y posteriormente flameándola. Se obtuvo un gramo de pulpa esplénica el cual se introdujo en una bolsa de digestión estéril, añadiéndose 10 ml. de la solución tampón fosfato salino (PBS) a pH 7,4. A continuación la suspensión se procesó mediante el digestor Stomacher (IUL® Masticator Classic 400 ml.). De la porción líquida se extrajeron dos alícuotas de 0,5 ml., que fueron dispensadas en tubos eppendorf sin ARNasas. Las muestras de tejido pareadas fueron almacenadas a -80°C, hasta su análisis.

4.3. Recopilación de información epidemiológica.

Paralelamente al muestreo, se recopilaron datos relativos a los animales analizados y otras características del

coto de tipo medioambiental, de gestión y de posibles vectores existentes en el mismo.

4.3.1. Variables generales.

Se denominaron como variables generales a aquellas que se hallaban asociadas a las muestras, como el año de recogida, la estación del año y la región geográfica (tabla M2).

Especie	Región	2006/2007	2007/2008	2008/2009	2009/2010	2010/2011	2011/2012	Total
Ciervo	Oriental	39	24	32	117	65	0	277
	Central	0	12	67	180	95	117	471
	Occidental	11	15	28	233	141	51	479
	Total	50	51	127	530	301	168	1227
Corzo	Oriental	0	0	0	0	0	0	0
	Central	0	0	4	3	2	0	9
	Occidental	0	10	19	102	10	0	141
	Total	0	10	23	105	12	0	150
Gamo	Oriental	8	0	4	24	6	0	42
	Central	0	0	6	47	18	45	116
	Occidental	0	9	0	25	89	15	138
	Total	8	9	10	96	113	60	296
Mufión	Oriental	2	0	16	12	5	0	35
	Central	0	0	4	21	8	0	33
	Occidental	0	0	0	20	44	0	64
	Total	2	0	20	53	57	0	132
Cabra montés	Oriental	8	39	236	203	0	0	486
	Central	10	66	64	101	0	0	241
	Occidental	0	6	22	15	0	0	43
	Total	18	111	322	319	0	0	770
Total		78	181	502	1103	483	228	2575

Tabla M2. Distribución de muestras serológicas por región y temporada de caza

Para esta última variable se tuvieron en cuenta tres zonas: oriental (Almería, Granada y Jaén), central (Córdoba y

Málaga) y occidental (Cádiz, Huelva y Sevilla) (Mapa M1).

4.3.2. Variables individuales.

Para conocer la información propia del animal se confeccionó una hoja de toma de muestras normalizada que permitiera relacionar los códigos de las muestras recopiladas con datos del animal capturado. Los datos recogidos incluyeron: el código individual, la especie, el sexo, la edad y las muestras tomadas para cada uno de los animales (sangre y/o bazo). El cuestionario individual fue cumplimentado paralelamente a la toma de muestras.

El dimorfismo sexual, muy evidente en los rumiantes, hace sencilla la diferenciación de género. La edad de los animales, fue determinada por grupos, incluyendo animales jóvenes (menores de 1 año de edad), subadultos (de 1 a 3 años) y adultos (mayores de 3 años), según la clasificación establecida por Sáenz de Buruaga y cols. (1991).

La caracterización de la edad se estableció con gran exactitud en los bóvidos, muflón y cabra montés, contando el número de medrones o anillos cornuales (Fandos y Vigal, 1988; Santiago-Moreno y cols., 2004).

En los cérvidos, la determinación de la edad se realizó en base al examen de las piezas dentales; se consideraron jóvenes aquellos que mantuvieron todas sus piezas dentarias deciduas. Los animales fueron considerados subadultos cuando presentaron erupción de las primeras piezas

dentarias permanentes, mientras que aquellos que presentaron todas las pinzas permanentes fueron considerados adultos (Sáenz de Buruaga y cols., 1991).

En total, en 813 individuos los datos relativos al sexo y/o la edad, no pudieron ser recogidos.

	Machos					Hembras					D	Total
	A	SA	J	D	Total	A	SA	J	D	Total		
Cabra montés	108	30	41	10	189	150	44	50	12	256	325	770
Ciervo	353	115	15	2	485	263	100	39	52	454	288	1227
Corzo	69	14	0	0	83	6	3	0	0	9	58	150
Gamo	86	36	9	0	131	68	41	15	21	145	20	296
Muflón	60	7	1	0	68	23	13	3	1	40	24	132
Total	676	202	66	12	956	510	201	107	86	904	715	2575

Tabla M3. Distribución de muestras serológicas por sexo y edad. A:adulto; SA:subadulto; J: joven; D: desconocido.

4.3.3. Variables relacionadas con el hábitat

Con el fin de obtener información relacionada con el lugar donde los animales fueron abatidos o capturados, se confeccionó una encuesta epidemiológica (Anexo 2) que incluyó datos relacionados con el coto muestreado así como las medidas de gestión realizadas en los mismos. El cuestionario fue realizado considerando aquellos factores que pueden implicarse en la epidemiología de las arbovirosis, particularmente de la LA. Siempre que fue posible, las preguntas incluidas presentaron entre dos y

cinco opciones. La encuesta se rellenó en la misma zona de captura o bien por consulta telefónica contactando con los gestores, guardas o propietarios.

4.3.4. Variables relativas al vector

Las variables relacionadas con el vector fueron extraídas de los datos cedidos por la CAPMA que se definen en el Apartado 4.4: estos datos fueron tratados (Apartado 4.7.1.) para obtener variables que pudieran ser incluidas al en los análisis estadísticos.

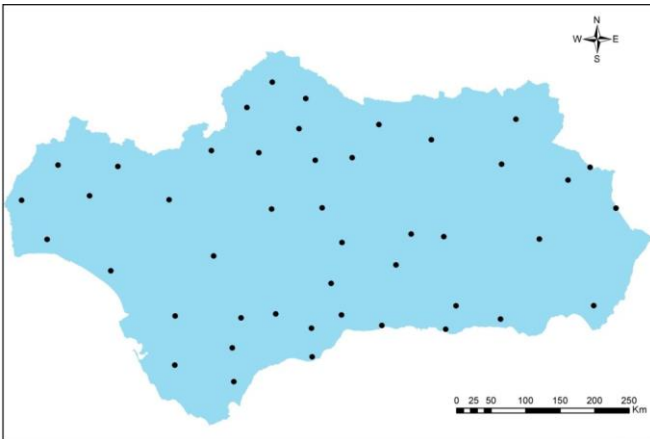
4.4. Datos entomológicos.

Los datos entomológicos de trampeo de *Culicoides* fueron amablemente cedidos por la CAPMA. La información facilitada por la Administración, extraída del Programa Andaluz de Vigilancia Entomológica para la Lengua Azul, abarca desde octubre de 2007 hasta el mismo mes de 2011. Los vectores capturados son del genero *Culicoides*, facilitándose un recuento total y un recuento individualizado para las especies: *C. imicola*, *C. obsoletus* (Complex), *C. obsoletus* (*sensu stricto*), *C. pulicaris*, *C. scoticus* y *C. nubeculosus*.

El muestreo de *Culicoides* se llevó a cabo en 45 explotaciones de ganado bovino distribuidas homogéneamente por toda la geografía andaluza (Mapa M2).

Las trampas empleadas fueron trampas CDC de luz

ultravioleta (modelo1212, CZ Veterinaria S.A., Porriño, España) (Imagen M1). El procedimiento de captura con este modelo de trampas se fundamenta un emisor de luz ultravioleta, atrayente para los mosquitos, situándose en la parte inferior un sistema succionador que aspira a los insectos conduciéndolos hasta un recipiente que los conserva hasta su recogida. Este tipo de trampas han sido utilizadas satisfactoriamente en estudios anteriores para la captura de este tipo de especies (Drigger y cols., 1980; Miranda y cols., 2008; Calvete y cols., 2008; Venter y cols., 2009; Pérez y cols., 2012).



Mapa M2. Distribución de las estaciones de captura de Culicoides en Andalucía

Los datos facilitados incluyeron la provincia, nombre de la estación de muestreo, coordenadas geográficas de la posición de la trampa, temperaturas mínimas y máximas y recuento total y por especie. La frecuencia de muestreo por ubicación osciló entre dos y seis veces por mes, mientras que las trampas eran activadas durante 72 horas.



Imagen M1. Trampa CDC de luz ultravioleta.

4.5. Uso de los Sistemas de Información Geográfica (SIG).

Los datos de información geográfica se obtuvieron de la página web del Instituto Geográfico Nacional (IGN), que

permite la descarga gratuita de hojas vectoriales y ráster. La información obtenida en campo con su situación mediante coordenadas geográficas, tanto en los lugares de muestreo como en las estaciones de *Culicoides*, fue posteriormente digitalizada vectorialmente. Para llevar a cabo los análisis espaciales se emplearon los programas informáticos Kosmo® Desktop (SAIG S.L., Plataforma SIG libre corporativa) y ArcGis® 9.3 (Environmental system research institute, Inc.)

Mediante el uso de los SIG también se localizaron los cotos y las estaciones de trampeo de vectores. Los datos de presencia y distribución de culicoides en cada uno de los cotos incluidos en el presente trabajo, se obtuvieron a partir de los datos obtenidos en las estaciones de muestreo más próximas al coto.

4.6. Análisis laboratoriales.

En este apartado se incluyen las diferentes técnicas serológicas y moleculares realizadas para la detección de ambos orbivirus.

4.6.1. Técnicas inmunoenzimáticas de detección de anticuerpos.

Un total 2.290 muestras de suero fueron analizadas frente al VLA y 798 frente al VEHE mediante el uso de técnicas inmunoenzimáticas. La distribución por especie, edad, sexo, temporada de caza y provincia se muestra en la tabla M4.

Técnicas serológicas		VLA	VEHE
Categorías	Variables		
Especies	Ciervo	1009	526
	Corzo	150	58
	Gamo	211	214
	Muflón	124	-
	Cabra montés	770	-
Edad	Adulto	1059	403
	Subadulto	365	234
	Joven	199	68
Sexo	Hembra	767	336
	Macho	808	364
Temporada de caza	2006/2007	78	47
	2007/2008	166	59
	2008/2009	502	53
	2009/2010	1103	207
	2010/2011	415	204
	2011/2012	-	228
Regiones	Oriental	878	123
	Central	736	347
	Occidental	650	328
Total		2264	798

Tabla M4. Muestras de suero analizadas mediante ELISA frente a VLA y VEHE.

4.6.1.1. ELISA VLA.

Las muestras de suero fueron analizadas en el laboratorio de serología del Departamento de Sanidad

Animal de la Universidad de Córdoba, para la determinación de anticuerpos frente al virus de la LA, mediante el uso del kit comercial INGEZIM BTV DR (12.BTV.K0) (Ingenasa S.A.). La técnica se fundamenta en un ensayo inmunoenzimático ELISA de doble reconocimiento en el que el antígeno empleado es la proteína recombinante VP7.

Según las indicaciones del fabricante, este ensayo presenta una alta sensibilidad (100%) y especificidad (99,8%) pudiendo detectar los 26 serotipos de la enfermedad (Laboratorio de referencia de la OIE, Pirbright) en diferentes especies.

La técnica se realizó de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante, siguiendo los pasos indicados a continuación:

Dilución de la muestra. Los sueros fueron diluidos al 50%, con el diluyente comercial incluido en el kit, pudiendo hacerse en el mismo pocillo añadiendo 50 µl de suero y 50 µl de diluyente. Los sueros controles positivos y negativos se añadieron por duplicado y sin diluir (100 µl), el control blanco estaba constituido por 100 µl de diluyente.

Incubación. La placa con los sueros y controles se incubaron durante 1 hora a 37°C. Durante este periodo de tiempo los sueros que presentaron anticuerpos frente a la proteína antigénica VP7 del VLA quedaron fijados a esta proteína que tapiza el fondo del pocillo.

Lavado. Se realizaron 6 lavados con 300 µl de solución de lavado, previamente elaborada con 1 parte de solución de lavado concentrada (25X) y 24 partes de agua destilada.

Adición del conjugado. Se añadieron 100 µl de la solución de la proteína antigénica VP7 conjugada con peroxidasa.

Incubación. La placa con los sueros y controles fue tapada e incubada durante 1 hora a 37°C. Durante este periodo de tiempo, la solución conjugada de proteína antigénica VP7 se unió a los anticuerpos fijados, en la primera incubación, que a su vez estaban unidos a las proteínas que tapizan el fondo del pocillo.

Lavado. Se repitió el procedimiento de 6 lavados con 300 µl de solución de lavado. En esta etapa las muestras que no presentaron anticuerpos frente a VLA no fijaron la proteína VP7 conjugada, con lo que esta fue arrastrada durante el lavado.

Adición del sustrato. Se añadieron 100 µl de solución de sustrato (TMB) a cada pocillo, y posteriormente se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en un lugar oscuro. La concentración de anticuerpos frente al VLA en el suero resulta proporcional a la intensidad del color en el pocillo.

Frenado. Se añadió la solución de frenado (ácido sulfúrico) con objeto de estabilizar la formación de

cromógeno oxidado, lo que permitió realizar la lectura de los resultados.

Lectura. Para la lectura de los resultados se empleó un espectrofotómetro de absorción molecular (Thermo® Scientific Multiscan FC) con un filtro de longitud de onda de 450 nm. Los valores de absorbancia obtenidos fueron descargados directamente del espectrofotómetro en formato Microsoft® Excel.

Validación de la prueba. Para la validación de la prueba el fabricante estima que el promedio de los controles positivos (pC+) deben presentar una absorbancia mayor a 0,8. Debiendo ser el promedio de los controles negativos (pC-) inferior al punto de corte (PC), para que el ensayo sea válido: $PC = pC+ \times 0,15$

Interpretación de resultados. Una muestra se consideró positiva (presencia de anticuerpos frente a VLA) cuando el valor de su densidad óptica fue superior al punto de corte. Consecuentemente, una muestra se consideró negativa (ausencia de anticuerpos frente a VLA) cuando su densidad óptica fue inferior al punto de corte.

4.6.1.2. ELISA VEHE.

La técnica ELISA para la detección de anticuerpos frente al VEHE fue realizada en el Laboratorio de Referencia de la OIE para el diagnóstico y la detección de enfermedades no vesiculares, situado en el Institute for Animal Health en

Pirbright, Reino Unido (IAH-P).

Las muestras fueron testadas mediante un kit comercial de ELISA de competición para la detección de IgG frente a la proteína VP7 del VEHE (ELISAc; LSIVet[®] VEHE Blocking Kit LSIVET, Lissieu, Francia). Este ELISA ha sido aprobado por la OIE como técnica de referencia para la detección de anticuerpos frente a VEHE en rumiantes y camélidos (OIE, 2012). Según las indicaciones del fabricante, la especificidad de la prueba alcanza el 100% en cérvidos.

La técnica se realizó de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante, siguiendo los pasos indicados a continuación:

Dilución de la muestra. Los sueros fueron diluidos en proporción 1:20 con el diluyente comercial proporcionado en el kit, añadiendo 7 µl de suero y 130 µl de diluyente. Los sueros controles positivos y negativos fueron dispensados y diluidos de la misma manera que las muestras.

Incubación. La placa con los sueros y controles fue tapada e incubada durante 15 minutos a 37°C.

Lavado. Se realizaron 3 lavados con 250 µl de solución de lavado, previamente elaborada con 1 parte de solución de lavado concentrada (25X) y 24 partes de agua destilada.

Adición del conjugado. Se añadieron 100 µl de la solución de la proteína antigénica VP7 conjugada con peroxidasa.

Incubación. La placa con los sueros y controles fue tapada e incubada durante 30 minutos a 37°C.

Lavado. Se repitió el procedimiento de 3 lavados con 250 µl de solución de lavado.

Adición del sustrato. 100 µl de solución de sustrato (TMB) fue añadida a cada pocillo, y posteriormente la placa fue incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente y en un lugar oscuro.

Frenado. Se añadió una solución de ácido sulfúrico con objeto de estabilizar la formación de cromógeno oxidado, antes de realizar la lectura.

Lectura. Para la lectura se empleó un espectrofotómetro de absorción molecular (Bio-Rad® iMark Microplatereader) a una longitud de onda de 450 nm. Los valores de absorbancia obtenidos fueron descargados directamente del espectrofotómetro, impresos e introducidos en la base de datos.

Validación de la prueba. Para validar la prueba los controles positivos (c+) deben presentar un porcentaje de inhibición (PI) superior al 60% y la densidad óptica (DO) de los controles negativos (c-) debe ser superior a 0,6. El PI fue calculado de la siguiente forma:

$$PI = \frac{((DO_{c-}) - (DO_{muestra}))}{DO_{c-}}$$

Interpretación de resultados. Una muestra fue considerada como positiva (presencia de anticuerpos frente a VLA) cuando el porcentaje de inhibición fue superior al 60%, mientras que se consideró como negativa (ausencia de anticuerpos frente a VLA) cuando su porcentaje de inhibición fue inferior al 60%.

4.6.2. Seroneutralización vírica del VLA.

Las muestras de suero que resultaron positivas al ensayo inmunoenzimático frente al VLA, fueron posteriormente procesadas en el Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA) mediante la técnica de SNV, técnica de referencia para la detección de anticuerpos frente a los diferentes serotipos del VLA (OIE, 2012).

El principio de la prueba se basa en determinar la actividad neutralizante de los anticuerpos presentes en la muestra frente a alguno de los 26 serotipos de VLA, expresado en un criterio de neutralización del 50%.

La técnica se realizó de acuerdo a los procedimientos indicados por la OIE, siguiendo los pasos indicados a continuación:

Preparación de los microtubos. En un micronic se colocaron los microtubos estériles de 1,2 µl.

Dilución del suero. La muestra fue diluida en proporción ½ con medio EMEM (125 µl: 125 µl). Si los sueros no presentan buenas condiciones, el efecto tóxico impide el

crecimiento de las células y la posterior lectura de los resultados.

Inactivación del suero. El suero fue inactivado a 56°C en baño maría durante 30 minutos.

Preparación de las plantillas. Si los sueros fueron analizados frente a más de un serotipo, se hicieron réplicas de las plantillas ya confeccionadas; tantas como serotipos a analizar.

Adición de medio EMEM. Se distribuyeron 100 µl de medio EMEM en los pocillos control y 50 µl en el resto de pocillos de la placa.

Adición de los sueros. Se añadieron 100µl de las muestras de suero en los pocillos (A) que correspondían a la dilución inicial (1/2). Progresivamente se fueron realizando diluciones dobles seriadas, transfiriendo 50 µl consecutivamente al pocillo inferior (desde la posición A hasta la H) alcanzando finalmente la concentración 1/256. Se descartó el volumen de 50 µl sobrante de la última dilución.

Adición de la suspensión vírica. Se distribuyeron 50 µl de la suspensión de virus (100 TCID₅₀) en todos los pocillos, excepto en el control de crecimiento de las células y en los pocillos destinados a las diluciones del control de virus.

Adición del control del virus. Se añadieron 50 µl de las distintas concentraciones del control del virus a los pocillos control. Para ello fue necesario preparar las distintas

concentraciones dispensando 900 μl de medio EMEM en 3 microtubos realizando diluciones a 10^1 , 10^2 y 10^3 , a partir de la suspensión vírica ya preparada y distribuyendo 100 μl en el tubo 10^1 . Las concentraciones 10^2 y 10^3 se alcanzaron partiendo de 100 μl de la concentración previa (10^1 y 10^2 , respectivamente).

Incubación. Las placas se mantuvieron durante 1 hora y 30 minutos a 37°C y con 5% de CO_2 .

Adición de las células. Se añadieron 100 μl de la suspensión de células Vero en todos los pocillos.

Incubación. Las placas se mantuvieron durante 6 días a 37°C y 5% de CO_2 .

Lectura. Para ello, se buscó la aparición de un efecto citopático usando un microscopio invertido.

4.6.3. Técnicas de detección molecular.

4.6.3.1. Extracción de ARN.

Para facilitar el proceso de detección mediante técnicas moleculares se realizó una extracción del ARN del virus. Este proceso consiste en la separación del ARN del resto de los componentes celulares como proteínas o membranas lipídicas mediante el uso de detergentes y sales precipitantes.

Las extracciones se realizaron usando el Kit Qiagen® ARN extraction Kit. El protocolo seguido fue el siguiente:

Se dispusieron tubos de 1,5 ml libres de nucleasas a los que se adicionó 560 μ l de Buffer AVL y 140 μ l de la muestra, incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Los tubos se centrifugaron durante 9 segundos a 1.000 rpm (Centrifuge 5415D Eppendorf) para la eliminación de los restos que permanecieron en el tapón.

Se añadió a cada tubo 560 μ l de etanol y se homogeneizó con un vórtex.

Los tubos fueron centrifugados durante 9 segundos a 1.000 rpm.

Preparación de tubos nuevos con filtro Qlamp Mini Spin Column®.

Adición de 630 μ l de la solución de extracción.

Los tubos fueron centrifugados durante 1 minuto a 8.000 rpm.

Se repitió el paso 9º y 10º cambiando el filtro para realizar la centrifugación.

La base del filtro fue sustituida de nuevo y se añadió 500 μ l de buffer AW1.

Los tubos se centrifugaron 1 minuto a 8.000 rpm.

La base del filtro fue sustituida de nuevo y añadiendo 500 μ l de buffer AW2.

Los tubos fueron centrifugados 3 minutos a 12.000 rpm.

Se cambió la base del filtro y los tubos fueron centrifugados durante 1 minuto a 12.000 rpm.

Los tubos Eppendorf de 1,5 ml se colocaron como base del filtro y se adicionó 35 µl de agua desionizada libre de ARNasas (Buffer AVE QIAGEN®).

Las muestras fueron incubadas durante 10 minutos.

Los tubos fueron finalmente centrifugados durante 1 minuto a 8.000 rpm.

4.6.3.2. rRT-PCR genérica para el VLA.

Se utilizó una rRT-PCR semicuantitativa, basada en la detección de una región conservada del SEG-5 del VLA (Toussaint y cols., 2007). La reacción es llevada a cabo conjuntamente con la desnaturalización, la retrotranscripción, la amplificación y la detección a tiempo real del ARN. El amplificado obtenido es un producto de 75 pares de bases de una secuencia del segmento 5 del genoma del virus. Esta técnica permite detectar la presencia de ARN del VLA desde el primer día post infección, incluso hasta más de 200 dpi en algunas especies de rumiantes (Bonneau y cols., 2002).

Las secuencias de los 3 primers empleados han sido las siguientes:

5' GGCAACYACCAAACATGGA 3'

5' AAAGTYCTCGTCGCATTWGC 3'

5' FAM-YCCA+CTG+ATRTT+GTA+TT+TT+CTCAA-TAMRA3'

Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Producción y Sanidad Animal de Sevilla.

El procedimiento se describe a continuación:

Preparación de la solución master-mix. La master-mix fue preparada en un tubo Eppendorf de 2 ml, en condiciones de refrigeración. Las concentraciones utilizadas de cada reactivo fueron: DNTP (0,5 mM), cloruro de Magnesio (5 mM), Polimerasa (1.000 Uds/reacción), primers (1'25 µM), Sonda Taqman (0'25 µM) y retrotranscriptasa (1.000 Uds/reacción).

Distribución de las muestras en la placa. Las muestras previamente extraídas y los controles, se añadieron en una placa de 96 pocillos. La cantidad dispensada en cada pocillo fue de 6 µl. A continuación, la placa se selló empleando una tapa adhesiva de plástico.

Desnaturalización del ARN. Las muestras fueron calentadas en el termociclador durante 5 minutos a 99°C (ABI 7500 Fast Applied Biosystems®). Tras esta fase se enfriaron mediante el uso de una gradilla congelada para evitar la renaturalización del ARN.

Centrifugación. Las muestras fueron centrifugadas para evitar la acumulación de aerosoles evaporados durante

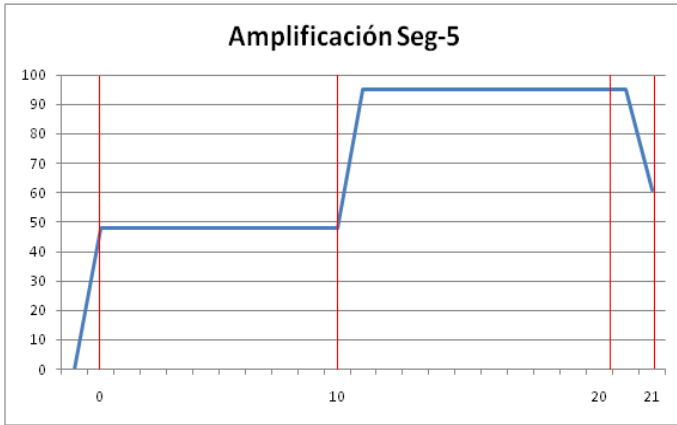
el proceso de calentamiento.

Más tarde se añadió la solución master-mix en cada uno de los pocillos. Tras la adición la placa fue sellada.

Amplificación. La placa con la muestra fue introducida en el termociclador (ABI 7500 Fast Applied Biosystems®) donde se ajustó el siguiente programa de amplificación: un ciclo de 10' a 48°C, un ciclo de 10' a 95°C, seguidos de 50 ciclos de 15'' a 95°C y 60'' a 61°C.

Detección de la fluorescencia a tiempo real. El termociclador lleva incorporado un detector de fluorescencia que realiza una lectura tras cada ciclo de amplificación. La sonda de fluorescencia Taq-man® hibrida específicamente con el gen diana (SEG-5) del virus, que al ser degradado por la polimerasa durante la síntesis de nuevas cadenas de ácidos nucleicos, reacciona emitiendo fluorescencia.

Interpretación de los resultados. Los resultados vienen determinados por el valor CT (Cycle Threshold), que se traduce como el umbral del ciclo calculado por el algoritmo del termociclador, en el que empieza a haber una respuesta exponencial en la señal de fluorescencia. Ese ciclo es tanto menor cuanto mayor es la cantidad de ADN diana en la muestra. Por tanto consideramos a las muestras con valores iguales o menores a 40 ciclos como positivas.



Gráfica M1. Ciclos de temperatura para la amplificación del SEG-5

4.6.3.3. rRT-PCR específica de serotipo para el VLA.

Las técnicas empleadas para la determinación del serotipo se basan en la detección mediante rRT-PCR de secuencias específicas del SEG-2 del genoma de VLA. Las pruebas se realizaron para los tres serotipos detectados en España.

El análisis molecular mediante rRT-PCR para el VLA-1 fue llevado a cabo mediante el procedimiento desarrollado por Agüero y cols. (2008); sin embargo la descripción de la técnica no ha sido publicada. Las RT-PCR específicas se realizaron en el Laboratorio Central de Algete, considerado como Laboratorio de Referencia del VLA en España.

La rRt-PCR específica para el VLA-4 ha sido realizada en el Laboratorio de Referencia del VLA en España en Algete.

La técnica empleada para la detección de VLA-8 fue descrita por Hoffmann y cols. (2009), y se basa en la detección de una secuencia específica de 86 pb del segmento 2 del ARN viral de este serotipo sirviéndonos de los siguientes primers:

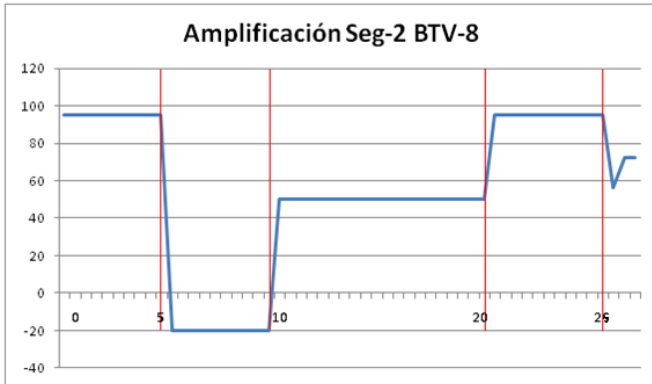
5´ GTT ACG CAT TAC CGA GGT TGT G 3´
5´ GAT CAT GTG TGA ACG CCT TCG 3´
5´ AAC GGC TCA CAC CGA CGA TCC AGC 3´

Para el desarrollo de la técnica se utilizó el extracto de ARN de la muestra previamente confirmada como positiva mediante RT-PCR genérica. El protocolo fue similar al descrito para la RT-PCR genérica, por lo que únicamente se ha detallado la composición de la master-mix y los ciclos de amplificación utilizados:

La solución master-mix se preparó utilizando los siguientes reactivos: 2X reaction MIX (12,5 µl), mezcla de primers (2 µl), agua libre de nucleasas (5,0 µl), retrotranscriptasa (0,5 µl).

Al igual que en la rRT-PCR genérica, se depositaron en la placa 6 µl de la muestra de ARN previamente extraído, a la que se le añadieron 20 µl de la solución de master-mix. Los ciclos de amplificación y su evolución gráfica fueron: un ciclo

de 10' a 48°C, un ciclo de 5' a 95°C, seguidos de 42 ciclos de 15'' a 95°C, 20'' a 56°C y 30'' a 72°C.



Gráfica M1. Ciclos de temperatura para la amplificación del SEG-2

4.6.4. Aislamiento del virus.

El cultivo del VLA en la línea celular KC se llevó a cabo de la siguiente forma:

Tapizado del Frasco (BD Falcon® Cell culture) de 25 ml. Previamente a la adición de la muestra se añadió una solución constituida por: línea celular KC (2 ml), Schneider insect medium (2 ml), FCS (900 µl), Peni/Strepto (75 µl), Anfotericina B (25 µl).

El frasco con la solución preparada se colocó con su

superficie más amplia en la base, manteniéndolo en la estufa de CO₂ a 28°C. Las células alcanzaron en un día entre el 80 y el 90% de la superficie tapizada, que es la cantidad óptima para propiciar el crecimiento del virus.

Adición del VLA. Para realizar la inoculación del virus, se eliminó el medio de crecimiento existente en el frasco y se volvió a añadir medio Scheneider con la misma concentración de antibióticos pero sin SFB. Se inocularon directamente 0,5 ml de la muestra de tejido, sin extraer. Esta solución se mantuvo durante 7 días a 28°C.

Confirmación microscópica. Se realizó un examen previo con el uso del microscopio para confirmar la presencia del efecto citopático.

Confirmación del aislamiento mediante técnicas moleculares. El incremento del título viral (disminución de la CT) fue comprobado mediante RT-PCR. Si el valor CT de la muestra obtenido para el cultivo celular resultó menor que el obtenido para tejido, el aislamiento del virus puede considerarse satisfactorio. En el caso contrario, si los títulos virales no aumentaron, se realizaron pases sucesivos para favorecer este incremento, y confirmar o descartar la viabilidad del virus.

4.7. Métodos y análisis estadísticos

4.7.1. Tratamiento de las variables de los estudios serológicos.

Los datos epidemiológicos obtenidos mediante las encuestas, los resultados de diagnóstico serológico frente a los dos virus estudiados, así como los datos de trapeo de culicoides, fueron introducidos en el programa Microsoft Excel[®] 2007 (Microsoft Corporation). Tras adecuar la base de datos, estos fueron exportados al programa estadístico SPSS[®] versión 15.0 para Windows (Lead Technologies Inc.) donde finalmente se realizaron los análisis estadísticos correspondientes.

Antes de la realización de los análisis estadísticos se hace necesario realizar una serie de operaciones de tratamiento y organización de los datos. Estas operaciones incluyen la eliminación, el cambio y la redefinición de las diferentes variables.

4.7.1.1. Definición de variables.

Las variables incluidas en el estudio fueron tratadas, según su carácter, aplicando análisis estadísticos diferentes. Estas variables pueden ser de tipo numérico, cuando los valores que toman indican una cantidad; o bien de tipo nominal, si existen distintas categorías dentro de cada variable. Las variables nominales podemos clasificarlas, a su vez, en variables dicotómicas, cuando sólo existen dos

categorías, variables nominales de más de dos categorías y variables ordinales, en las que las diferentes categorías presentan un orden establecido.

4.7.1.2. Categorización de variables numéricas.

Las variables numéricas, que en nuestro caso fueron *Densidad de silvestres*, *Superficie del coto*, así como las relativas a la densidad de culicoides, fueron objeto de categorización y, según sus valores, se incluyen dentro de diferentes categorías diseñadas. El establecimiento de cada categoría se estableció de manera independiente para cada una de ellas, siguiendo criterios previamente recogidos en la bibliografía, de tipo administrativo o según su distribución para los datos obtenidos. Finalmente, para estas variables categóricas se calculó la distribución de frecuencias en cada una de sus categorías.

En el caso de la variable *Densidad de silvestres*, la categorización se realizó teniendo en cuenta la bibliografía sobre abundancia de rumiantes silvestres existente en el sur de la Península Ibérica (Acevedo y cols., 2008). La variable *Superficie del coto* se decidió categorizarla atendiendo al criterio de la CAPMA, que considera a los cotos, a partir de 2000 Has como de gran extensión y por tanto permite cerrarlas con cerca cinegética (BOJA, 2007) (tabla M5).

Variable	Categoría	Criterio
Densidad de silvestres	Baja	1-4 individuos/100 Has
	Media	5-20 individuos/100 Has
	Alta	>20 individuos/100 Has
Superficie del coto	Pequeña y media	< 2000 Has
	Grande	≥ 2000 Has

Tabla M5. Categorización de Densidad de silvestres y Superficie del coto.

Las variables numéricas relativas a la densidad de *Culicoides* fueron categorizadas según se define en el apartado 4.7.2.2.

4.7.1.3. Eliminación de variables.

Algunas variables sin interés epidemiológico como el propietario, el número de teléfono del titular, el número de coto o el orden de introducción en la base de datos fueron eliminadas. Del mismo modo, tras realizar el análisis estadístico descriptivo de los datos se decidió eliminar las variables con frecuencias muy altas (>95%) o muy bajas (<5%) para alguna de sus categorías ya que éstas generan incorrecciones de tipo estadístico.

4.7.1.4. Codificación de variables.

Las variables nominales se codificaron de forma numérica para facilitar su tratamiento estadístico mediante el programa SPSS 15.0, asignándose un número a cada categoría (categoría A, 1; categoría B, 2; categoría C, 3,

siguiendo este protocolo de forma sucesiva). A las variables dicotómicas se les asignó un valor de 0 para las negativas, y de 1 para las afirmativas.

4.7.2. Tratamiento de datos entomológicos.

El tratamiento de los datos entomológicos presentó algunas particularidades debido a la gran cantidad de datos disponibles y, como consecuencia, de su inclusión como variables en el estudio de factores de riesgo.

4.7.2.1. Cálculo de estimadores el estudio descriptivo.

Para el estudio entomológico se calculó el recuento total (RT), estimado en base a la suma de los mosquitos capturados en cada trampa de forma total y por especies.

Así mismo, se estableció un estimador para conocer la presencia de las especies de culicoides en cada mes del año. Para su cálculo se consideraron como positivas a aquellas estaciones que presentaron al menos un mosquito capturado en ese mes. La presencia de culicoides fue calculada en forma de porcentaje de trampeos positivos (PTP) sobre el total realizados, tanto para la presencia del genero *Culicoides* como para cada especie incluida.

Finalmente se calculó la media de mosquitos capturados para cada estación de trampeo. El objeto de esta operación fue permitir que los datos obtenidos fueran comparables entre diferentes localizaciones. De esta forma, algunos condicionantes, como el aumento de la presión de

capturas no influiría en la comparación de resultados.

$$\text{Media de captura} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de } \textit{Culicoides} \text{ capturados}}{\text{N}^{\circ} \text{ de trampeos realizados}}$$

La media de capturas se calculó de forma general para cada estación, expresada como densidad de culicoides (DC), por provincias y por años de trampeo, incluyendo las trampas que resultaron negativas. Así mismo, se incluyó también la media de los trampeos positivos por provincia y por año de muestreo, expresada como densidad de culicoides por trampa positiva (DCTP) con objeto de conocer la eficacia de la trampa empleada en nuestro estudio.

4.7.2.2. Cálculo de las variables relativas a culicoides.

En el estudio de factores de riesgo para el VLA se incluyeron diferentes variables relacionadas con los vectores transmisores de la enfermedad, tanto de tipo mensual como anual.

Para el cálculo de las variables incluidas en el estudio epidemiológico se procedió de manera similar al cálculo de la *Media de captura* anteriormente definido. En el caso de las variables mensuales incluidas (ej.: “*Total Culicoides mensual*”), se estableció una media rodante, teniendo en cuenta los datos de trampeo (de la estación de trampeo más cercana al lugar de muestreo serológico) desde el día en que la muestra de suero fue tomada hasta el mismo día del mes anterior. El mismo procedimiento fue seguido para las

variables anuales (ej.: “*Total Culicoides anual*”) variando en el periodo de capturas considerado, que incluyó desde el año previo hasta la recogida de la muestra de campo.

Las variables numéricas de abundancia del vector fueron categorizadas para su inclusión como variables en el estudio de factores de riesgo. La ausencia del vector fue considerada una categoría en sí misma, por lo que para el establecimiento del resto de categorías sólo se contabilizaron aquellas trampas en las que hubiese presencia de vectores (mensual o anual, según la variable). La categorización se realizó mediante el uso de terciles tanto para el recuento total como para cada una de las especies. Para las variables por especies se sumaron las medias obtenidas de las trampas positivas de todas las especies de culicoides en conjunto (tabla M6).

Medias de captura	Categoría	Criterio	Criterio (numérico)
Mensuales	Ausencia	Ausencia	0
	Baja	1 ^{er} tercil	0,01-1,59
	Media	2 ^{do} tercil	1,60-6,39
	Alta	3 ^{er} tercil	6,40-2058,20
Anuales	Ausencia	Ausencia	0
	Baja	1 ^{er} tercil	0,01-1,29
	Media	2 ^{do} tercil	1,30-2,99
	Alta	3 ^{er} tercil	3,00-491,3

Tabla M6. Categorización de la abundancia del vector

4.7.3. Estudios estadísticos realizados

4.7.3.1. Análisis descriptivo univariante

El análisis descriptivo permite definir la distribución de cada una de las variables incluidas en un estudio. Estos procedimientos fueron utilizados para el estudio epidemiológico de factores de riesgo frente al VLA, para el estudio descriptivo del VEHE y para el estudio descriptivo de los datos de culicoides capturados en Andalucía.

Para las variables numéricas se calcularon los principales estadísticos de tendencia central (media, mediana y moda) y dispersión (varianza, desviación típica y rango). Posteriormente, para estas variables se establecieron categorías de manera independiente atendiendo a criterios epidemiológicos. Finalmente, se obtuvieron variables nominales ordinales de entre tres y cinco categorías.

Una vez obtenidas y transformadas todas las variables en variables nominales, se calculó la distribución de frecuencias de cada una de las categorías.

Los resultados de seroprevalencia permiten la posterior realización de los estudios de factores de riesgo.

Los datos entomológicos de captura de culicoides también fueron analizados descriptivamente. Los resultados solo incluyeron recuentos totales, sin embargo diferentes

variables estimadas a partir de estos fueron incluidas posteriormente. Estas nuevas variables fueron calculadas (4.7.2.1.) tomando como ejemplo las definidas para otros estudios realizados en Andalucía (Ortega y cols., 1998; Ortega y cols., 1999; Pérez y cols., 2012).

4.7.3.2. Análisis descriptivo bivariante.

El análisis bivariante fue utilizado en el estudio epidemiológico de factores de riesgo frente al VLA, utilizando el resultado de serología total (sueros positivos a ELISA y a SNV) como variable dependiente. Para ello se realizó una tabla de contingencia que contiene todas las variables independientes consideradas y su relación con la variable dependiente.

Para contrastar la hipótesis de independencia entre las variables se utilizó prueba de Chi-cuadrado (χ^2). La asociación se comprobó mediante el valor “ p ” asociado aplicando la “corrección de Pearson”.

Los resultados obtenidos fueron la presencia o ausencia de significación estadística de cada variable respecto a la variable dependiente. Sólo aquellos factores que presentaron un resultado con un valor de $p < 0,15$, fueron incluidos en el análisis de regresión multivariante.

4.7.3.3. Análisis de correlaciones múltiples

La posible correlación (colinealidad) existente entre las variables predictivas que presentaron una asociación

significativa con la variable dependiente ($p < 0,15$), fue realizada mediante la utilización del coeficiente de correlación de Spearman (r).

La colinealidad entre dos variables se estableció cuando $p < 0,05$ y $r > 0,4$. En estos casos solamente la variable con una asociación más fuerte con la seropositividad al VLA fue seleccionada para su inclusión en el modelo de regresión logística multivariante.

4.7.3.4. Análisis de regresión multivariante

El modelo multivariante permitió mejorar la estimación de las relaciones entre la variable resultado y las predictivas; para este análisis sólo se ha utilizado aquellas variables asociadas con una elevada significación con la seropositividad al VLA.

Dado que la variable dependiente es de tipo dicotómica (seropositivo o seronegativo) y las variables predictoras pueden ser de muy diversos tipos, el análisis que permite determinar de una forma más adecuada aquellos factores que presentan una influencia significativa con la seropositividad frente al VLA, es la regresión logística binomial. El objetivo de la regresión logística es componer un modelo sencillo y que describa la relación entre la variable dependiente y diferentes variables explicativas (o covariables).

La finalidad de cualquier modelo predictivo es

obtener, a partir de un amplio conjunto de factores, aquellos que predicen mejor un efecto, en nuestro caso la presencia de anticuerpos frente al VLA que supone que ese individuo ha sido infectado. Por tanto, partiendo de este amplio número de variables, que “*a priori*” cuentan con el mismo peso específico, se hizo necesario llevar a cabo con anterioridad los análisis descriptivos univariante y bivariante, con objeto de seleccionar aquellas que resultaran incluidas en el modelo multivariante.

En este estudio, la selección de las variables empleada se realizó en base al método de paso a paso hacia adelante (*forward stepwise*) tomando como referencia el estadístico de Wald (Hosmer y Lameshow, 1989). En el modelo obtenido se definen las variables asociadas a la seropositividad frente al VLA, así como la fuerza con la que cada uno de estos factores se relacionan con ella eliminando, además, el efecto de las variables confundentes (*confounding*). Por otra parte, el modelo muestra la capacidad en que puede predecir tanto los individuos seropositivos como los seronegativos.

Finalmente, la determinación y trascendencia de estos factores de riesgo (o protección) nos permitirá, en última instancia, diseñar un plan de lucha frente a esta virosis en las poblaciones de rumiantes salvajes.

4.7.3.4. Elaboración del árbol de decisión CHAID

Además, los resultados fueron expresados mediante

un árbol de representación gráfica CHAID, que define los grupos de mayor riesgo para la presencia de infección frente al VLA.

Se incluyó un análisis de las variables significativas obtenidas en el modelo multivariante mediante el uso del detector de interacción automatizada de χ^2 (CHAID). Este tipo de estudios se fundamentan en las pruebas de significación ajustadas, como χ^2 , que permiten establecer un orden de significación entre los factores seleccionados (Kass, 1979). La presentación visual del método CHAID se realiza mediante un árbol de clasificación (o decisión). En el árbol están representados diversos grupos que surgen de la combinación de las categorías de las variables incluidas. La finalidad del análisis fue establecer aquellos grupos que presentan mayor y menor riesgo de presencia de anticuerpos frente al VLA, representándolos gráficamente, facilitando así la interpretación de los resultados.

5. Resultados y discusión

5. 1. Estudios serológicos

5.1.1. Estudio de seroprevalencia del VLA

Se han analizado un total de 2.290 muestras para la detección de anticuerpos frente al VLA sirviéndonos de un C-ELISA; posteriormente, las muestras que resultaron positivas fueron analizadas mediante SNV frente a los tres serotipos circulantes en el sur de España (VLA-1, VLA-4 y VLA-8), utilizando las dos técnicas en tandem.

La técnica ELISA utilizada en el presente estudio presenta una elevada sensibilidad y especificidad en el ganado doméstico (Niedbalski, 2010) y ha sido previamente empleado en ungulados silvestres (García y cols., 2009; Lorca-Oró y cols., 2011). La SNV es una técnica que presenta una elevada especificidad, independientemente de la especie, permitiendo llevar a cabo la detección de los diferentes serotipos del VLA, aunque su sensibilidad es algo menor.

Para estimar la seroprevalencia, tan solo se consideraron sueros positivos aquellos que mostraron resultados positivos a ambas técnicas. El 3,6 por ciento (82/2264) de las muestras analizadas resultaron positivas a ELISA pero negativas a SNV, diferencias que pueden relacionarse con los diferentes tipos de anticuerpos que cada una de ellas permite detectar. Así mismo, el 1,8 por ciento

(38/2264) de las muestras positivas a ELISA no pudieron ser analizadas mediante SNV debido a la citotoxicidad del suero, posiblemente debido a la contaminación del mismo. Los resultados obtenidos usando ambas técnicas (C-ELISA+SNV: 495/2226) en tándem podrían estar subestimados respecto a los obtenidos exclusivamente por C-ELISA (570/2264), pero indudablemente presentan una mayor fiabilidad, por lo que fueron seleccionados para expresar la seroprevalencia. No obstante, cabe destacar que tanto la seroprevalencia (C-ELISA+SNV+) como los porcentajes de seropositividad obtenidos para C-ELISA han seguido un patrón muy similar para las categorías individuales y relativas al muestreo (tabla RD1).

Los resultados han mostrado la elevada difusión que el VLA ha tenido en Andalucía durante el periodo de estudio, alcanzando una seroprevalencia del 21,9 por ciento. Sin embargo la distribución geográfica de la enfermedad no ha sido homogénea, describiéndose prevalencias significativamente más elevadas ($p < 0,05$) en las regiones central y occidental de Andalucía con el 28,3 por ciento y el 29,8 por ciento, respectivamente, en comparación con la región oriental donde alcanzó un 10,9 por ciento de individuos seropositivos.

Categorías	Variables	Técnicas serológicas					
		C-ELISA			C-ELISA+SNV+		
		Total	+	%	Total	+	Preval.
Especies	Ciervo	1009	437	43,3	986	384	38,9
	Corzo	150	3	2,0	150	3	2,0
	Gamo	211	63	29,9	211	61	28,9
	Muflón	124	36	29,0	123	33	26,8
	Cabra m.	770	31	4,0	746	14	1,8
	Total	2264	570	25,2	2226	488	21,9
Edad	Adulto	1059	340	32,1	1059	312	30,2
	Subadulto	365	78	21,4	365	75	20,7
	Joven	199	24	12,1	199	23	11,7
	Total	1623	442	35,1	1592	410	25,7
Sexo	Hembra	767	198	25,8	767	176	22,9
	Macho	808	256	31,7	808	243	30,1
	Total	1575	454	28,8	1575	419	26,6
Temporada de caza	2006/2007	78	34	43,6	78	24	30,8
	2007/2008	166	35	21,1	161	24	14,9
	2008/2009	502	56	11,2	497	44	8,9
	2009/2010	1103	305	27,6	1099	258	23,5
	2010/2011	415	140	33,7	391	138	35,3
	Total	2264	570	25,2	2226	488	21,9
Región	Oriental	878	119	13,5	874	95	10,9
	Central	736	234	31,8	726	206	28,4
	Occidental	650	217	33,3	626	187	29,9
	Total	2264	570	25,2	2226	495	21,9

Tabla RD1. Seropositividad frente al VLA.

Las prevalencias de anticuerpos obtenidas confirman una difusión significativamente superior ($p < 0,05$) en las poblaciones de ciervo (38,9%), seguidas de las de gamo

(28,9%) y muflón (26,8%), comparados con cabra montés (1,8%) y corzo (2%). Así mismo, los animales adultos presentaron seroprevalencias significativamente más elevadas (30,3%) en comparación con los subadultos (20,7%), siendo a su vez la prevalencia de este grupo más elevada que en los jóvenes (11,7%). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre sexos, siendo la seroprevalencia del 30,1 y 22,9 por ciento en machos y hembras, respectivamente.

La distribución temporal mostró diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes temporadas de caza ($p < 0,05$). La seroprevalencia osciló entre el 8,9 por ciento en la temporada 2008/2009 y el 35,3 por ciento durante el periodo 2010/2011.

Por su parte, el estudio de circulación de serotipos supone el primero de este tipo realizado en especies silvestres en España. Al igual que en el ganado doméstico, las seroprevalencias encontradas frente al VLA-1 (18,5%) y frente al VLA-4 (15,4%), evidencian que ambos serotipos han presentado una amplia difusión en las poblaciones de rumiantes silvestres en Andalucía (tabla RD2).

En el caso del VLA-8, la escasa seroprevalencia (2,1%) concuerda con la menor circulación de este serotipo detectada en rumiantes domésticos en el sur de la península, donde sólo 26 focos han sido declarados (RASVE, 2013).

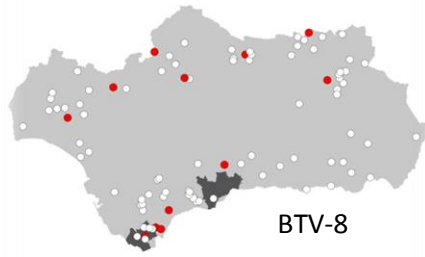
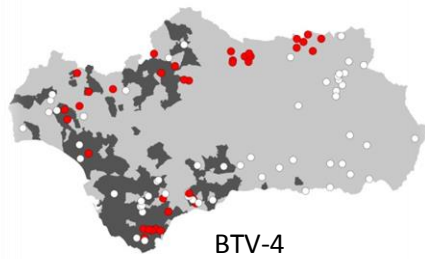
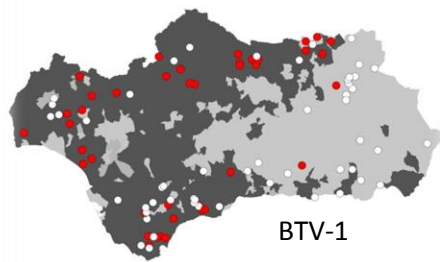
		Resultados SNV por serotipos						
		Total	BTv-1		BTv-4		BTv-8	
			Pos.	Prev.	Pos.	Prev.	Pos.	Prev.
Especies	Ciervo	986	283	28,7	232	23,5	29	2,9
	Corzo	150	2	1,3	2	1,3	0	0,0
	Gamo	211	45	21,3	31	14,7	9	4,3
	Muflón	123	15	12,2	26	21,1	7	5,7
	Cabra m	746	7	0,9	10	1,3	1	0,1
	Total	2226	351	15,8	293	13,2	46	2,1
Edad	Adulto	1059	237	22,4	196	18,5	19	1,8
	Subadulto	365	60	16,4	36	9,9	6	1,6
	Joven	199	14	7,0	15	7,5	4	2,0
	Total	1592	297	18,7	247	15,5	46	2,9
Sexo	Hembra	767	137	17,9	113	14,7	9	1,2
	Macho	808	184	22,8	137	17,0	21	2,6
	Total	1575	321	20,4	250	15,9	30	1,9
Temporada de caza	2006/2007	78	0	0,0	24	30,8	0	0,0
	2007/2008	161	14	8,7	15	9,3	0	0,0
	2008/2009	497	34	6,8	25	5,0	2	0,4
	2009/2010	1099	196	17,8	151	13,7	22	2,0
	2010/2011	391	107	27,4	78	19,9	22	5,6
	Total	2226	351	15,8	293	13,2	46	2,1
Región	Oriental	874	36	4,1	62	7,1	6	0,7
	Central	726	170	23,4	114	15,7	18	2,4
	Occidental	626	145	23,2	117	18,7	22	3,5
	Total	2226	351	15,8	293	13,2	46	2,1

Tabla RD2. Seroprevalencia frente a diferentes serotipos del VLA

No obstante, la circulación del VLA-8 ha sido confirmada en algunas zonas de Sierra Morena, unos 150 Km al norte del brote más cercano detectado en domésticos. Resultados similares fueron igualmente observados para VLA-1 y VLA-4. Esta amplia distribución indica una mayor

expansión geográfica del VLA asociado a las especies silvestres (García y cols., 2009; Lorca-Oró y cols., 2011) en relación a los brotes detectados en el ganado doméstico (Mapa RD1), tal vez debido las masivas campañas de vacunación realizadas en estas que limitarían la circulación del virus.

Ninguno de los animales analizados presentó anticuerpos específicos frente a VLA-1, VLA-4 y VLA-8 antes de la primera detección del primer brote de estos serotipos en el ganado doméstico. La seropositividad observada en individuos juveniles y subadultos, evidenció el contacto serológico con el virus incluso años después de que el último brote de este serotipo fuera notificado en las especies domésticas, lo que indica una circulación reciente en las poblaciones silvestres. Este hecho puede ser consecuencia del mantenimiento del ciclo del virus en las especies silvestres o bien producto de una nueva entrada de este serotipo por medio de animales o vectores infectados.



*Mapa RD1.
Distribución por
serotipos de los
brotes en
especies
domésticas y de
la circulación en
rumiantes
silvestres*

*En negro los
municipios que
presentaron brotes
en el ganado
doméstico; en gris
los que no. En
círculos rojos los
cotos positivos al
VLA mediante SNV;
en círculos blancos
los negativos para
cada uno de los
serotipos*

Tras la implementación del programa de vacunación en el ganado, un bajo número de brotes fueron declarados en las especies domésticas, por lo que se asume su eficacia como medida de prevención de la enfermedad en Andalucía (Allepuz y cols., 2010). Sin embargo, la elevada difusión del VLA observada en ciervo, y en menor medida en gamo y muflón, sugieren que el virus podría infectar al ganado doméstico cuando se produzca el cese de la vacunación obligatoria. Así mismo, los resultados muestran que las especies salvajes presentan gran utilidad para llevar a cabo la vigilancia epidemiológica del VLA en áreas donde los programas de vacunación obligatoria en las especies domésticas permanezcan vigentes.

5.1.2. Estudio de seroprevalencia del VEHE.

Los análisis realizados en el estudio de epidemiovigilancia frente al VEHE mediante la técnica ELISA no han evidenciado positividad en ninguna de las 798 muestras de suero de cérvidos analizadas.

Los resultados serológicos obtenidos confirmaron la ausencia de circulación del VEHE en los cérvidos salvajes muestreados en Andalucía entre 2006 y 2012. Aunque con técnicas diferentes, los resultados obtenidos se encuentran en concordancia con el estudio llevado a cabo en la provincia de Cádiz durante julio de 2007 por Rodríguez-Sánchez y cols. (2010), donde no se detectó ARN del VEHE en ninguna de las 510 muestras de sangre procedente de ciervos de granja. Así

mismo, de las 798 muestras de suero incluidas en nuestro estudio, 709 fueron también testadas para detectar anticuerpos frente al VLA mediante C-ELISA y SNV, mostrando un seropositividad del 52,0 por ciento (369/709), lo que indica ausencia de reacciones cruzadas entre ambos virus con las técnicas ensayadas (Arenas-Montes y cols. 2013).

Dada la amplia distribución que las especies de cérvidos salvajes, particularmente el ciervo, presentan en el sur de la península Ibérica, la vigilancia de diferentes enfermedades transmitidas por vectores ha sido previamente sugerida, siendo la LA un claro ejemplo de ello (Gortázar y cols., 2006; Falconi y cols., 2011; García-Bocanegra y cols., 2011). En este sentido, aunque todos los sueros resultaron negativos frente a EHE, la vigilancia serológica de estas especies puede ser considerada como una herramienta útil para la monitorización de esta enfermedad.

No obstante, aunque el papel que desarrollan los cérvidos europeos en la epidemiología de la EHE es aún desconocido, algunas infecciones experimentales con VEHE-1 realizadas en estas especies (ciervo, gamo y corzo), demostrando su susceptibilidad para este serotipo concreto (Gibbs y cols., 1977), lo que sugiere que los cérvidos europeos podrían actuar como hospedadores competentes del VEHE.

Sin embargo, en el brote detectado en Marruecos provocado por VEHE-6 que afectó clínicamente a ganado bovino, no se describió ningún caso de infección en otros rumiantes domésticos o silvestres (Benazzou, 2006). En este sentido, algunos sueros de camélidos analizados por Touil y cols. (2012) mostraron resultados negativos frente a anticuerpos del VEHE-6. Por el contrario, estudios serológicos llevados a cabo en Arabia Saudí en 1991 pusieron de manifiesto la infección en ciervo rojo, aunque las técnicas genéricas empleadas no permitieron distinguir entre serotipos, sí se conoce que VEHE-6 estuvo circulando en el vecino país de Omán a finales de los años 1980 (Al-busaidy y Mellor, 1991).

Las muestras de los rumiantes silvestres analizadas en el presente estudio fueron obtenidas en las diferentes regiones de Andalucía (Mapa M1). No obstante, se analizaron un mayor número de ejemplares procedentes de la provincia de Cádiz (190), dado que es la región más al sur de Europa y la más próxima al continente africano. Además, desde 2004, diversos brotes por arbovirus (los tres serotipos del VLA, el VWN y el virus de Bagaza) han sido detectados en esta provincia (Jiménez-Clavero et al., 2012).

Los patrones de distribución del VEHE y del VLA suelen diferir frecuentemente en aquellos lugares donde ambos virus coexisten, como se ha definido previamente tanto para especies silvestres como domésticas (Stallknecht y cols.,

1995; Kedimi y cols., 2011b). Stallknecht y cols. (1995) sugieren que existen diferencias notables en la amplificación y transmisión para ambos virus e incluso entre sus serotipos dependiendo de la especie de culicoides implicada.

Por tanto, aunque no se hayan detectado muestras positivas frente al VEHE, existen algunos condicionantes que pueden posibilitar que la EHE pueda afectar en un futuro a las especies de rumiantes de la península ibérica:

La proximidad con el norte de África, considerada como la puerta de entrada de muchas de las arbovirosis que han afectado a la península Ibérica en los últimos años.

La presencia de vectores competentes, ya que las elevadas densidades de *C. imicola* registradas en los últimos años en Andalucía y la competencia que ha demostrado esta especie para amplificar y transmitir satisfactoriamente el VEHE en otras zonas, la sitúan como la especie clave en la posible expansión de este virus. Un papel parecido podrían jugar otras especies de culicoides del complejo *obsoletus* o *C. pulicaris* cuya presencia en Andalucía también ha sido notificada (Calvete y cols., 2008; Savini y cols., 2011; Pérez y cols., 2012), siendo igualmente especies de vectores competentes para la transmisión del VEHE.

Las elevadas densidades de rumiantes salvajes y domésticos existentes en el sur de la península (Acevedo y cols., 2008), unido al tradicional aprovechamiento en

extensivo, favorece el contacto entre estas especies y, consecuentemente, el riesgo de transmisión de enfermedades (Gortázar y cols., 2007).

Por tanto, teniendo en cuenta estos condicionantes, se puede considerar que la emergencia de la EHE en el sur de España puede suponer un riesgo real para las poblaciones de rumiantes domésticos y silvestres, siendo necesario llevar a cabo programas de vigilancia epidemiológico en estas especies.

5.2. Estudio de factores de riesgo del VLA

El estudio de factores de riesgo se llevó a cabo teniendo en cuenta sólo a los animales de vida libre (se eliminaron de este estudio todos los animales reclusos en instalaciones intensivamente controladas), utilizando los resultados de serología total (obtenidos mediante el ELISA y la SNV en tándem) y relacionándolos con las variables tomadas en la encuesta epidemiológica.

5.2.1. Análisis descriptivo y bivariante.

En los datos expuestos se incluyen la distribución de frecuencias por categorías, la relación de muestras totales y positivas frente al VLA y la seroprevalencia o porcentaje de seropositividad de estas categorías. También se exponen los resultados obtenidos mediante la prueba de χ^2 de Pearson, que permitió evaluar si existieron diferencias estadísticamente significativas entre las categorías de las diferentes variables independientes en relación a la variable

dependiente.

La distribución de frecuencias de las variables generales se representa en la tabla RD3. Como se puede observar, el porcentaje de animales muestreados en las tres regiones de Andalucía es muy similar, oscilando entre el 28,9 por ciento de la zona oriental y el 36,3 por ciento del área occidental.

El mayor número de muestras tomadas en la temporada 2009/2010, con el 52,2% del total se debió a la aportación conjunta desde la UCO y la CAPMA. En cuanto a las estaciones del año, los mayores porcentajes de muestras obtenidas durante los meses de otoño e invierno, coinciden con el periodo hábil de caza mayor en Andalucía (tabla RD3).

Variables generales	Categoría	Total	Porcentaje
Región	Oriental	463	28,9
	Central	558	34,8
	Occidental	581	36,3
Temporada de caza	2006/2007	70	4,4
	2007/2008	70	4,4
	2008/2009	249	15,5
	2009/2010	837	52,2
	2010/2011	376	23,5
Estación del año	Invierno	526	32,8
	Otoño	900	56,2
	Primavera	104	6,5
	Verano	72	4,9

Tabla RD3. Distribución de frecuencias de las variables generales.

En el estudio bivalente de las variables generales se incluyeron tablas de contingencia detalladas por especie, con el objetivo de mejorar la descripción de los datos de distribución y prevalencia (tabla RD4). Se observaron seroprevalencias más elevadas en la zona occidental y central, en comparación el área oriental de Andalucía ($\chi^2=41,49$; $p<0,001$). En este sentido García y cols. (2009) ya señalaron este patrón, describiendo mayores seroprevalencias en la zona occidental en comparación con la parte oriental de la región andaluza.

La seroprevalencia varió significativamente en las diferentes temporadas de caza ($\chi^2=29,42$; $p<0,001$), presentándose los valores más elevados durante el periodo 2006/2007 (34,3%), descendiendo hasta el 16,5 por ciento en la temporada 2008/2009, probablemente como consecuencia del elevado número de individuos de cabra montés analizados durante ese año (89/267). En las temporadas posteriores la seropositividad aumentó hasta alcanzar el 36,7 por ciento en la última temporada incluida en el estudio (Gráfico RD1).

Variable	Especie		Ciervo		Gamo		Mufión		Corzo		Cabra montés		Total						
	Categoría	Total	+	%	Total	+	%	Total	+	%	Total	+	%	Total	+	%			
Región	Oriental	297	85	28,6	42	1	2,4	35	1	2,9	0	0,0	89	0	0,0	463	87	18,8	
	Central	355	154	43,4	73	35	47,9	25	11	44,0	7	0	0,0	98	2	2,0	558	202	36,2
	Occidental	319	145	45,5	96	25	26,0	63	21	33,3	97	2	2,1	6	0	0,0	581	193	33,2
Temporada de caza	2006/2007	50	23	46,0	8	1	12,5	2	0	0,0	0	0	0,0	10	0	0,0	70	24	34,3
	2007/2008	45	23	51,1	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	25	0	0,0	70	23	32,9
	2008/2009	127	38	29,9	10	1	10,0	20	1	5,3	3	0	0,0	89	1	1,1	249	41	16,5
	2009/2010	530	208	39,2	96	28	29,2	53	17	47,2	89	2	2,2	69	1	1,5	837	256	30,6
Estación del año	2010/2011	219	92	42,0	97	31	32,0	48	15	45,5	12	0	0,0	0	0	0,0	376	138	36,7
	Invierno	313	129	41,2	39	1	2,6	47	10	3,4	58	2	21,3	69	0	0,0	526	142	27,0
	Otoño	608	249	41,0	168	60	35,7	72	23	0,0	12	0	31,9	40	1	2,5	900	333	37,0
	Primavera	4	0	0,0	4	0	0,0	4	0	0,0	29	0	0,0	63	1	1,6	104	1	1,0
Verano	46	6	13,0	0	0	0,0	0	0	0,0	5	0	0,0	21	0	0,0	72	6	8,3	

Tabla RD4. Tabla de contingencia de las variables generales.

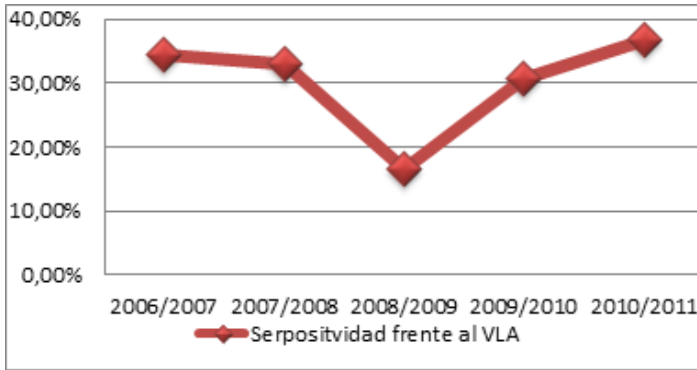


Gráfico RD1. Seropositividad por Temporada de caza mediante C-ELISA frente al VLA

En cuanto a las estaciones del año, se observaron mayores porcentajes de seropositividad en otoño e invierno respecto al verano y la primavera, presentando esta variable variaciones significativas entre sus categorías ($\chi^2=80,9$; $p<0,001$). Esto, que ya se ha demostrado para otras enfermedades de transmisión vectorial, puede ser debido a que la respuesta inmune es posterior a la transmisión, que se produce al final del verano en estas latitudes por la actividad de los vectores.

Atendiendo a las variables individuales, podemos observar que la distribución de muestras por especies (tabla RD5) se encuentra en concordancia con la abundancia de estas en los ecosistemas del sur de España. Considerando la distribución por edades se observa un mayor porcentaje de

muestras pertenecientes a individuos adultos, ya que son los de este grupo de edad los que son abatidos con mayor frecuencia en las actividades cinegéticas.

La razón de sexos (*sex ratio*) de las muestras obtenidas en el presente estudio fue prácticamente de 1, siendo ligeramente superior el número de machos, hecho asociado al mayor número de animales abatidos por su trofeo.

Variables	Categoría	Nº de muestras	%
Especie	Ciervo	971	60,6
	Gamo	211	13,2
	Muflón	123	7,7
	Corzo	104	6,5
	Cabra mon.	193	12,0
Edad	Joven	100	8,2
	Subadulto	289	23,7
	Adulto	829	68,1
Sexo	Hembra	519	44,7
	Macho	641	55,3

Tabla RD5. Distribución de frecuencias de las variables individuales.

El análisis bivariante muestra los resultados entre las diferentes especies de rumiantes salvajes incluidas en el estudio, donde se observaron prevalencias significativamente superiores ($\chi^2= 156,5$; $p<0,001$) en ciervo, gamo y muflón, en comparación con corzo y cabra montés (tabla RD 6).

La prevalencia se incrementó significativamente con la edad de los animales ($\chi^2= 17,38$; $p<0,001$). En los adultos se apreciaron mayores seroprevalencias (36,9%) en comparación con los individuos subadultos (25,6%) y jóvenes (21,0%).

Especie		Ciervo			Gamo			Mullón			Corzo			Cabra montés			Total			χ^2 de Pearson		
Variables	Categoría	Total	+	%	Total	+	%	Total	+	%	Total	+	%	Total	+	%	Total	+	%	Valor	gl	Sig. asintótica p
Edad	Joven	72	17	23,6	13	4	30,8	6	0	0,0	0	0	0,0	9	0	0,0	100	21	21,0	17,4	2	< 0,001
	Subadulto	164	46	28,0	64	21	32,8	22	5	22,7	18	2	11,1	21	0	0,0	289	74	25,6			
	Adulto	474	247	52,1	117	33	28,2	77	25	32,5	73	0	0,0	88	1	1,1	829	306	36,9			
Sexo	Hembra	326	141	43,3	93	24	25,8	40	7	17,5	8	0	0,0	52	0	0,0	519	172	33,1	2,1	1	0,142
	Macho	357	179	50,1	98	34	34,7	59	23	39,0	81	2	2,5	46	1	2,2	641	239	37,3			
Total por especie		971	384	39,5	211	61	28,9	123	33	26,8	104	2	1,9	193	2	1,0	1602	482	30,1	156,5	4	< 0,001

Tabla RD6. Tabla de contingencia de las variables individuales

No se observaron diferencias significativas en la seroprevalencia encontrada frente al VLA teniendo en cuenta el sexo del animal ($\chi^2= 2,15$; $p =0,142$), oscilando entre el 33 por ciento de las hembras y el 37 por ciento en los machos. Otros estudios realizados en especies silvestres tampoco evidenciaron diferencias entre animales de distinto sexo (Ruiz-Fons y cols., 2008; García y cols. 2009; Lorca-Oró y cols., 2011; García-Bocanegra y cols., 2011). No obstante, en las investigaciones de Rossi y cols. (2013) describieron

diferencias significativamente superiores en machos que en hembras.

Las variables propias del coto son aquellas que se han considerado como intrínsecas de cada terreno cinegético, incluyendo variables sobre las que el gestor no tiene influencia o no siempre puede tenerla (ej.: especies presentes en el coto).

Tanto la densidad de rumiantes silvestres como la superficie de los cotos fueron tomadas como variables numéricas (tabla RD 7). No obstante, en el caso de la variable *densidad de silvestres*, esta fue clasificada según la bibliografía existente, categorizándolas en bajas, medias y altas (tabla M5). La variable *superficie del coto* se clasificó en dos categorías: pequeñas/medias y grandes.

Variables	N	Media	Desv. tip.	Moda	Mediana	Mínimo	Máximo
Extensión del coto	1602	9951,7	18238,4	14109	2308	90	82400
Densidad de silvestres	1602	28,3	15,7	42	22	0,7	75

Tabla RD7. Medidas de tendencia central y de dispersión para las variables numéricas

Atendiendo a sus categorías, se presentaron densidades de rumiantes silvestres medias (0,05-0,2 individuos/Ha) o elevadas (>0,2 individuos/Ha) en la mayoría de los cotos incluidos en el estudio, con porcentajes

cercanos al 44 por ciento para ambas categorías, ascendiendo los muestreados en cotos de bajas densidades (<0,05 individuos/Ha) al 11,7 por ciento. Las elevadas densidades de rumiantes silvestres encontradas en las zonas muestreadas son frecuentes el sur de la península ibérica (Acevedo y cols., 2008). Así mismo, un mayor número de sueros (58,0%) fueron tomados en cotos de gran superficie (≥ 2000 Has.) respecto al 42,0% de los muestreados en cotos pequeños y medianos (<2000 Has.)

El 74,1 por ciento de las muestras fueron tomadas en bosques de quercíneas (conformado predominantemente por especies de *Quercus*), respecto al resto, que se recogieron en zonas con una composición forestal diferente. Del mismo modo, se apreció la presencia de ríos en cotos que incluían a más del 96 por ciento de los rumiantes salvajes estudiados, alcanzando el 75 por ciento en el caso de las aguas estancadas.

Las explotaciones de alta densidad de silvestres presentaron una frecuencia significativamente más elevada de animales seropositivos (50,1%) observándose diferencias significativas entre las categorías ($\chi^2=246,9$; $p<0,001$). Así mismo, se presentó asociación estadísticamente significativa entre la variable superficie del coto y la seropositividad al VLA ($\chi^2=28,7$; $p<0,001$), presentándose un 37,3 por ciento de individuos positivos en las fincas con superficie menor a 2.000 Has., respecto al 24,9 por ciento observado en las

grandes superficies de terreno.

Variable	Categoría	Total	%
Densidad silvestres	Baja	187	11,7
	Media	704	43,9
	Alta	711	44,4
Superficie del coto	Pequeñas/medias	673	42,0
	Grandes	929	58,0
Tipo de monte predominante	Quercíneas	1187	74,1
	Pinares	285	17,8
	Otros	130	8,1
Aguas corrientes	No	59	3,7
	Sí	1543	96,3
Aguas estancadas	No	394	24,6
	Sí	1208	75,4

Tabla RD8. Distribución de frecuencias de variables propias del coto

Los rumiantes salvajes que habitaron en zonas donde el bosque predominante era el de quercíneas presentaron un porcentaje de anticuerpos frente al VLA (34,4%) superior en comparación con aquellos que lo fueron muestreados en zonas de pino (22,1%) o de otro tipo de monte (8,5%), presentándose diferencias significativas entre las categorías ($\chi^2=47,9$; $p<0,001$).

Del mismo modo, se presentaron prevalencias significativamente más elevadas en aquellos animales que tuvieron contacto con *aguas estancadas* ($\chi^2=30,9$; $p<0,001$)

que alcanzaron una prevalencia superior al 30 por ciento.

Variable	Categoría	Total	+	%	Valor	gl	p
Densidad silvestres	Baja	187	14	7,5	246,9	2	<0,001
	Media	704	112	15,9			
	Alta	711	356	50,1			
Superficie del coto	Peq. med.	673	251	37,3	28,7	1	<0,001
	Grandes	929	231	24,9			
Tipo monte predomina.	Quercus	1187	408	34,4	47,9	2	<0,001
	Pinares	285	63	22,1			
	Otros	130	11	8,5			
Aguas corrientes	No	59	11	18,6	3,8	1	0,052
	Sí	1543	471	30,5			
Aguas estancadas	No	394	75	19,0	30,9	1	<0,001
	Sí	1208	407	33,7			

Tabla RD9. Tabla de contingencia para las variables propias del coto.

Considerando las variables asociadas a la gestión del coto, la mayoría de las muestras fueron tomadas en espacios libres (76,9%), siendo también una amplia mayoría de cotos gestionados por la Administración pública (61,2%). Gran parte de las explotaciones cinegéticas (82,9%) suplementan con alimento en la época de verano. Igualmente, la mayoría de los cotos han acondicionado bebederos de tipo artificial (bebederos para el ganado, pilas, fuentes, pantanetas, etc). El 96,1 por ciento de los cotos presentaron un guarda encargado del mantenimiento y la vigilancia, por lo que esta variable no fue incluida en el análisis estadístico bivariante.

Variable	Categoría	Total	%
Cercado perimetral	No	1232	76,9
	Sí	370	23,1
Guardería	No	63	3,9
	Sí	1539	96,1
Bebederos	Ausencia	109	6,8
	Presencia	1493	53,6
Comederos	Ausencia	274	17,1
	Presencia	1328	82,9
Tipo de gestión	Pública	981	61,2
	Privada	621	38,8

Tabla RD10. Distribución de frecuencias de las variables relacionadas con la gestión del coto.

La seroprevalencia fue mayor en los cotos que emplearon medidas de gestión más intensivas; en este sentido, los animales procedentes de finca cercadas presentaron prevalencias de anticuerpos del 39,5 por ciento, significativamente más elevadas en comparación con el 27,3 por ciento observado en las fincas no cercadas ($\chi^2=20,1$; $p<0,001$). Así mismo, la seropositividad fue mayor en cotos con presencia de bebederos (30,7%) ($\chi^2=7,5$; $p=0,02$) y comederos (33,7%) ($\chi^2=258,5$; $p<0,001$) respecto a los cotos con ausencia de estas medidas. Igualmente, en los cotos gestionados de forma privada se presentó un mayor porcentaje de individuos con presencia de anticuerpos frente al VLA (42,0%) que los gestionadas por la Administración (22,5%) ($\chi^2=68,7$; $p<0,001$).

Variable	Categoría	Total	+	%	Valor	gl.	p
Cercado perimetral	No	1232	336	27,3	20,1	1	<0,001
	Sí	370	146	39,5			
Guardería	No	63	33	52,4	-	-	-
	Sí	1539	449	29,2			
Bebederos	Ausencia	109	23	21,1	7,5	1	0,02
	Presencia	1493	459	30,7			
Comederos	Ausencia	274	34	12,4	258,5	1	<0,001
	Presencia	1328	448	33,7			
Tipo de gestión	Pública	981	221	22,5	68,7	1	<0,001
	Privada	621	261	42,0			

Tabla RD11. Tabla de contingencia para las variables relacionadas con la gestión del coto.

En relación a las variables asociadas al aprovechamiento del coto, se comprueba cómo la mayoría de los animales incluidos en el estudio fueron animales abatidos en cotos de caza; sin embargo un 7 por ciento fueron capturados o abatidos en espacios gestionados por la Administración donde la actividad cinegética no está permitida, aunque sí los descastes para reducir poblaciones y los saneamientos selectivos de animales enfermos.

Variable	Categoría	Total	%
Aprovechamiento cinegético	No	112	7,0
	si	1490	93,0
Aprovechamiento ganadero	No	336	21,0
	Sí	1266	79,0
Aprovechamiento agrícola	No	659	41,1
	si	943	58,9
Cultivos de secano	Ausencia	710	44,3
	Presencia	892	55,7
Cultivos de regadío	Ausencia	1201	74,9
	Presencia	401	25,1

Tabla RD12. Distribución de frecuencias de las variables asociadas al aprovechamiento del coto.

Así mismo, se observa una mayor frecuencia de muestras pertenecientes a cotos con aprovechamiento ganadero (79%). La mayoría de las explotaciones con aprovechamiento agrícola (58,9%), presentaron cultivos de secano (55,7%), siendo esta frecuencia de un 25,1 por ciento para los cultivos de regadío, menos extendidos en las zonas generalmente montañosas donde se encuentran los rumiantes silvestres.

La frecuencia de animales seropositivos resultó de un 30,5 por ciento en aquellos animales que se encontraron en explotaciones con aprovechamiento cinegético y de un 24,1 por ciento en aquellas que no lo presentaron ($\chi^2=2,1$; $p=0,152$). En cuanto al aprovechamiento ganadero, el 49 por ciento de los rumiantes silvestres que no presentaron

contacto con el ganado resultaron positivos frente al VLA, frente al 24,9 por ciento de los que sí lo presentaron ($\chi^2=77,8$; $p<0,001$).

Se observó un 33,4 por ciento de individuos seropositivos en aquellos lugares donde no existía aprovechamiento agrícola, en comparación con 24,1 por ciento encontrado los cotos donde sí se llevó a cabo esta actividad ($\chi^2=5,8$; $p=0,016$). Esta tendencia se mantiene para las zonas con cultivos de secano con porcentajes más próximos entre ambas categorías, 30,9 por ciento (*ausencia*) y 29,4 por ciento (*presencia*) ($\chi^2=0,5$; $p=0,48$). En los cotos con cultivos de regadío se aprecian seroprevalencias menores (20,2%) que en aquellos con ausencia de este tipo que presentaron un 33,3 por ciento, apreciándose significación estadística ($\chi^2=34,9$; $p<0,001$).

Variable	Categoría	Total	+	%	Valor	gl	p																																												
Aprovechamiento cinegético	No	112	27	24,1	2,1	1	0,152																																												
	Sí	1490	455	30,5				Aprovechamiento ganadero	No	336	167	49,7	77,8	1	<0,001	Sí	1266	315	24,9	Aprovechamiento agrícola	No	659	220	33,4	5,8	1	0,016	Sí	943	262	27,8	Cultivos de secano	Ausencia	710	220	30,9	0,5	1	0,48	Presencia	892	262	29,4	Cultivos de regadío	Ausencia	1201	401	33,3	34,9	1	<0,001
Aprovechamiento ganadero	No	336	167	49,7	77,8	1	<0,001																																												
	Sí	1266	315	24,9				Aprovechamiento agrícola	No	659	220	33,4	5,8	1	0,016	Sí	943	262	27,8	Cultivos de secano	Ausencia	710	220	30,9	0,5	1	0,48	Presencia	892	262	29,4	Cultivos de regadío	Ausencia	1201	401	33,3	34,9	1	<0,001	Presencia	401	81	20,2								
Aprovechamiento agrícola	No	659	220	33,4	5,8	1	0,016																																												
	Sí	943	262	27,8				Cultivos de secano	Ausencia	710	220	30,9	0,5	1	0,48	Presencia	892	262	29,4	Cultivos de regadío	Ausencia	1201	401	33,3	34,9	1	<0,001	Presencia	401	81	20,2																				
Cultivos de secano	Ausencia	710	220	30,9	0,5	1	0,48																																												
	Presencia	892	262	29,4				Cultivos de regadío	Ausencia	1201	401	33,3	34,9	1	<0,001	Presencia	401	81	20,2																																
Cultivos de regadío	Ausencia	1201	401	33,3	34,9	1	<0,001																																												
	Presencia	401	81	20,2																																															

Tabla RD13. Tabla de contingencia para las variables asociadas al aprovechamiento del coto

Las variables relacionadas con la presencia de especies cinegéticas muestran que los animales que conviven con jabalí y ciervo presentaron unas seroprevalencias superiores al 90 por ciento. En cuanto al resto de especies cinegéticas, el 58,7 por ciento de los animales muestreados compartieron hábitat con gamos, el 45,2 por ciento con cabra montés, el 41,2 por ciento con muflón y el 31,3 por ciento con corzo.

La seropositividad frente al VLA fue de un 33,1 por ciento en las zonas con presencia de ciervos, frente al 1,3 por ciento de aquellos donde no estaba presente, observándose diferencias significativas entre las categorías ($\chi^2=77,8$; $p<0,001$). Así mismo, la seropositividad en fincas con presencia de gamos (32,3%) fue mayor que la obtenida en áreas sin presencia de esta especie (26,9%) ($\chi^2=5,3$; $p=0,021$).

El contacto con muflón ha supuesto menores seroprevalencias en las especies muestreadas (25,5%) que aquellas que no compartieron hábitat con esta especie (33,3%), presentándose valores $\chi^2=11$ y $p=0,02$). Igualmente, la frecuencia de positivos frente al VLA fue de un 14,6 por ciento en zonas con presencia de cabra montés, respecto a los valores del 42,8 por ciento observado en los lugares donde no se describió la presencia de dicha especie ($\chi^2=149,8$; $p<0,001$). La seroprevalencia en áreas con presencia y ausencia de corzos fue del 19,8 y 34,8 por ciento,

respectivamente, observándose diferencias significativas entre ambas categorías ($\chi^2=36,9$; $p<0,001$).

Variable	Categoría	Total	%
Presencia ciervo	No	154	9,6
	Sí	1448	90,4
Presencia gamo	No	661	41,3
	Sí	941	58,7
Presencia muflón	No	942	58,8
	Sí	660	41,2
Presencia cabra montés	No	878	54,8
	Sí	724	45,2
Presencia corzo	No	1101	68,7
	Sí	501	31,3
Presencia jabalí	No	35	2,2
	Sí	1567	97,8

Tabla RD14. Distribución de frecuencias de las variables relacionadas con la presencia de especies cinegéticas en el coto.

Del mismo modo, un 30,7 por ciento de individuos resultaron seropositivos al VLA en aquellos lugares con presencia de jabalíes frente al 2,9 por ciento de seropositividad detectada en animales sin contacto con esta especie, sin embargo esta variable no fue incluida en el análisis bivariante al presentar una frecuencia superior al 95 por ciento en una de sus categorías (tabla RD 15).

Variable	Categoría	Total	+	%	Valor	gl	p																																																								
Presencia de ciervo	No	154	2	1,3	67,1	1	<0,001																																																								
	Sí	1448	480	33,1				Presencia de gamo	No	661	178	26,9	5,3	1	0,021	Sí	941	304	32,3	Presencia de muflón	No	942	314	33,3	11	1	0,02	Sí	660	168	25,5	Presencia cabra mon.	No	878	376	42,8	149,8	1	<0,001	Sí	724	106	14,6	Presencia de corzo	No	1101	383	34,8	36,9	1	<0,001	Sí	501	99	19,8	Presencia de jabalíes	No	35	1	2,9	-	-	-
Presencia de gamo	No	661	178	26,9	5,3	1	0,021																																																								
	Sí	941	304	32,3				Presencia de muflón	No	942	314	33,3	11	1	0,02	Sí	660	168	25,5	Presencia cabra mon.	No	878	376	42,8	149,8	1	<0,001	Sí	724	106	14,6	Presencia de corzo	No	1101	383	34,8	36,9	1	<0,001	Sí	501	99	19,8	Presencia de jabalíes	No	35	1	2,9	-	-	-	Sí	1567	481	30,7								
Presencia de muflón	No	942	314	33,3	11	1	0,02																																																								
	Sí	660	168	25,5				Presencia cabra mon.	No	878	376	42,8	149,8	1	<0,001	Sí	724	106	14,6	Presencia de corzo	No	1101	383	34,8	36,9	1	<0,001	Sí	501	99	19,8	Presencia de jabalíes	No	35	1	2,9	-	-	-	Sí	1567	481	30,7																				
Presencia cabra mon.	No	878	376	42,8	149,8	1	<0,001																																																								
	Sí	724	106	14,6				Presencia de corzo	No	1101	383	34,8	36,9	1	<0,001	Sí	501	99	19,8	Presencia de jabalíes	No	35	1	2,9	-	-	-	Sí	1567	481	30,7																																
Presencia de corzo	No	1101	383	34,8	36,9	1	<0,001																																																								
	Sí	501	99	19,8				Presencia de jabalíes	No	35	1	2,9	-	-	-	Sí	1567	481	30,7																																												
Presencia de jabalíes	No	35	1	2,9	-	-	-																																																								
	Sí	1567	481	30,7																																																											

Tabla RD15. Tabla de contingencia para las variables asociadas a la presencia de especies cinegéticas en el coto

En cuanto a las especies domésticas, un 65,5 por ciento de los animales muestreados ha presentado contacto con el ganado bovino, seguido del 56,3 por ciento observado en el ovino. La presencia de equino en los lugares donde las muestras fueron tomadas, fue del 48,5 por ciento, siendo estos valores del 33,6 por ciento para el caprino y del 8 por ciento en el ganado porcino.

Variable	Categoría	Total	%
Presencia bovino	No	553	34,5
	Sí	1049	65,5
Presencia ovino	No	700	43,7
	Sí	902	56,3
Presencia caprino	No	1064	66,4
	Sí	538	33,6
Presencia porcino	No	1474	92,0
	Sí	128	8,0
Presencia equino	No	825	51,5
	Sí	777	48,5

Tabla RD16. Distribución de frecuencias de las variables relacionadas con las especies domésticas en el coto

La frecuencia de seropositivos en los ungulados silvestres muestreados que presentaron contacto con las poblaciones domésticas osciló entre el 10,6 por ciento observado para caprino y el 25,8 por ciento para porcino. Por el contrario, en aquellos animales que no compartieron hábitat con las especies domésticas se encontraron seroprevalencias más elevadas, siendo del 30,5 y 42,9 por ciento en áreas con ausencia de porcino y bovino, respectivamente.

Las variables *presencia de bovino* ($\chi^2=65,5$; $p<0,001$), *presencia de ovino* ($\chi^2=53,2$; $p<0,001$), *presencia de caprino* ($\chi^2=146,3$; $p<0,001$) y *presencia de equino* ($\chi^2=57,8$; $p<0,001$) presentaron una asociación estadísticamente significativa con a la variable dependiente, no observándose dicha asociación con la variable *presencia de porcino* ($\chi^2=1,2$; $p=0,26$).

Variable	Categ.	Total	+	%	χ^2	gl	p																																												
Presencia de bovino	No	553	237	42,9	65,5	1	<0,001																																												
	Sí	1049	245	23,4				Presencia de ovino	No	700	277	39,6	53,2	1	<0,001	Sí	902	205	22,7	Presencia de caprino	No	1064	425	39,9	146,3	1	<0,001	Sí	538	57	10,6	Presencia de porcino	No	1474	449	30,5	1,2	1	0,26	Sí	128	33	25,8	Presencia de equino	No	825	318	38,5	57,8	1	<0,001
Presencia de ovino	No	700	277	39,6	53,2	1	<0,001																																												
	Sí	902	205	22,7				Presencia de caprino	No	1064	425	39,9	146,3	1	<0,001	Sí	538	57	10,6	Presencia de porcino	No	1474	449	30,5	1,2	1	0,26	Sí	128	33	25,8	Presencia de equino	No	825	318	38,5	57,8	1	<0,001	Sí	777	164	21,1								
Presencia de caprino	No	1064	425	39,9	146,3	1	<0,001																																												
	Sí	538	57	10,6				Presencia de porcino	No	1474	449	30,5	1,2	1	0,26	Sí	128	33	25,8	Presencia de equino	No	825	318	38,5	57,8	1	<0,001	Sí	777	164	21,1																				
Presencia de porcino	No	1474	449	30,5	1,2	1	0,26																																												
	Sí	128	33	25,8				Presencia de equino	No	825	318	38,5	57,8	1	<0,001	Sí	777	164	21,1																																
Presencia de equino	No	825	318	38,5	57,8	1	<0,001																																												
	Sí	777	164	21,1																																															

Tabla RD17. Tabla de contingencia para las variables asociadas a la presencia de especies domésticas en el coto

La abundancia mensual del vector fue recalculada a partir de los datos originales. Las variables tanto mensuales como anuales de abundancia total de *Culicoides* y abundancia *C. imicola* presentaron una distribución muy similar. Las variables de abundancia fueron categorizadas atendiendo sólo a los resultados positivos, siendo el valor 0 (Ausencia) una categoría en sí misma (tabla M6).

Para las variables mensuales, un gran número rumiantes silvestres no presentaron contacto (ausencia) con los vectores en el mes anterior a la toma de muestras, hecho relacionado con que la mayoría de los sueros se tomaron durante la temporada otoñal e invernal, cuando las densidades de los vectores son menores.

Variables	N	Media	Desv. Est.	Moda Mediana Mínimo	Máximo
Total Culicoides	1511	19,27	182,83	0,00	2060,20
C. imicola	1511	19,03	182,67	0,00	2058,20
Complejo obsoletus	1511	0,17	1,02	0,00	14,67
C. obsoletus	1511	0,00	0,04	0,00	0,71
C. scoticus	1511	0,00	0,02	0,00	0,46
C. pulicaris	1511	0,04	0,38	0,00	12,80
C. nubeculosus	1511	0,06	0,37	0,00	2,50
C. dewulfii	1511	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla RD18. Medidas de tendencia central y de dispersión para las variables numéricas relacionadas con la abundancia mensual de culicoides

Se observó un mayor contacto de los rumiantes salvajes muestreados con la especie *C. imicola* respecto al resto de especies. En este sentido, la mayoría de los ungulados analizados que presentaron contacto, lo hicieron en lugares con densidades bajas (22%) respecto a los de las zonas de abundancia media (7,1%) y alta (12,9%) de *C. imicola*.

Los datos mensuales muestran escaso contacto entre los rumiantes silvestres y la especies del Grupo *obsoletus*, *C. pulicaris* y *C. nubeculosus*, o la baja presencia de estas especies de culicoides, situándose sus valores en torno al 7 por ciento de las muestras incluidas. Así mismo, la mayor parte de los animales analizados en los que se observó contacto con estas especies de vectores, lo hicieron en zonas

de bajas densidades de mosquitos. La presencia mensual de *C. scoticus* (0,3%) y *C. dewulfii* (0%) ha sido prácticamente marginal en la zona de estudio.

Variable	Categoría	Total	%
Total Culicoides	Ausencia	875	57,9
	Baja	333	22,0
	Media	108	7,1
	Alta	195	12,9
<i>C. imicola</i>	Ausencia	970	64,2
	Baja	303	20,1
	Media	53	3,5
	Alta	185	12,2
Complejo obsoletus	Ausencia	1394	92,3
	Baja	68	4,5
	Media	36	2,4
	Alta	13	0,9
<i>C. obsoletus</i>	Ausencia	1506	99,7
	Baja	5	0,3
<i>C. scoticus</i>	Ausencia	1507	99,7
	Baja	4	0,3
<i>C. pulicaris</i>	Ausencia	1415	93,6
	Baja	94	6,2
	Media	1	0,1
	Alta	1	0,1
<i>C. nubeculosus</i>	Ausencia	1424	94,2
	Baja	53	3,5
	Media	34	2,3
<i>C. dewulfii</i>	Ausencia	1511	100,0

Tabla RD19. Distribución de frecuencias de las variables asociadas a la abundancia mensual de vectores del género *Culicoides*

En los resultados obtenidos para la variable de abundancia mensual *C. imicola* podemos observar un porcentaje muy elevado de animales seropositivos en las zonas de bajas densidades (47,5%) respecto al resto de categorías incluida la ausencia, que oscilan entre el 25,1 por ciento y el 30,2 por ciento, apreciándose diferencias significativas entre las categorías ($\chi^2=57,7$; $p<0,001$). Resultados muy similares fueron los obtenidos para la abundancia total, en la que también se evidenció una asociación estadística significativa entre esta y la variable dependiente ($\chi^2=20,9$; $p<0,001$).

Para la variable *abundancia mensual C. nubeculosus*, también se aprecian diferencias entre sus categorías ($\chi^2=15,7$; $p<0,001$), existiendo un mayor porcentaje de rumiantes silvestres seropositivos en aquellas zonas con densidades medias de esta especie (52,9%), con respecto a las zonas con densidades bajas (13,2%) y ausencia (29,8%).

Es reseñable la frecuencia de animales seropositivos para las categorías baja, media y alta de Complejo *obsoletus*, que se sitúan entre el 7,4 y el 11,1 por ciento, en comparación con el 30,8 por ciento observado en ausencia de esta especie ($\chi^2=11,5$; $p=0,009$). Así mismo, la presencia con bajas densidades de *C. pulicaris* determinaron una seroprevalencia en estas zonas que alcanzó el 14,9 por ciento. Para las especies *C. obsoletus* mensual, *C. scoticus* mensual y *C. dewulfii* mensual se presentan categorías con

frecuencias superiores al 95%, por lo que estas fueron excluidas del análisis estadístico.

Variable	Categoría	Total	+	%	Valor	gl	p
Total Culicoides	Ausencia	875	237	27,1	20,9	3	<0,001
	Baja	333	131	39,3			
	Media	108	35	32,4			
	Alta	195	47	24,1			
C. imicola	Ausencia	970	243	25,1	57,7	3	<0,001
	Baja	303	144	47,5			
	Media	53	16	30,2			
	Alta	185	47	25,4			
Complejo obsoletus	Ausencia	1394	440	31,6	27,5	3	<0,001
	Baja	68	5	7,4			
	Media	36	4	11,1			
	Alta	13	1	7,7			
C. obsoletus	Ausencia	1506	450	29,9	-	-	-
	Baja	5	0	0,0			
C. scoticus	Ausencia	1507	450	29,9	-	-	-
	Baja	4	0	0,0			
C. pulicaris	Ausencia	1415	436	30,8	11,5	3	0,009
	Baja	94	14	14,9			
	Media	1	0	0,0			
	Alta	1	0	0,0			
C. nubeculosus	Ausencia	1424	425	29,8	15,7	2	<0,001
	Baja	53	7	13,2			
	Media	34	18	52,9			
C. dewulfii	Ausencia	1511	450	29,8	-	-	-

Tabla RD20. Tabla de contingencia para las variables asociadas a la abundancia mensual de vectores del género *Culicoides*

La abundancia anual total del vector y por especies, también se presentaron como variables numéricas. La media muestra que la abundancia anual esta también muy relacionada con la abundancia anual de *C. imicola*. De igual modo, la ausencia del vector y los valores bajos son los más repetidos. Las variables numéricas relativas a la abundancia del vector se categorizaron según se describió en el capítulo de Materiales y Métodos.

Variables	N	Media	Desv. Est.	Moda	Mediana	Míni	Máx
Total Culicoides	1526	20,28	83,11	0,58	2,55	0,00	493,46
<i>C. imicola</i>	1526	18,88	81,76	0,40	2,38	0,00	491,26
Complejo obsoletus	1526	0,48	0,98	0,00	0,17	0,00	26,80
<i>C. obsoletus</i>	1526	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00	0,13
<i>C. scoticus</i>	1526	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>C. pulicaris</i>	1526	0,31	1,22	0,00	0,04	0,00	13,03
<i>C. nubeculosus</i>	1526	0,60	3,41	0,00	0,00	0,00	27,69
<i>C. dewulfii</i>	1526	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla RD21. Medidas de tendencia central y de dispersión para las variables numéricas relacionadas con la abundancia anual de culicoides

El mayor número de muestras de animales salvajes se obtuvieron en zonas con presencia de *C. imicola* (90,5%), siendo la frecuencia mayor para la categoría de abundancia baja. Este mismo patrón fue observado para el Complejo *obsoletus*, ya que sólo el 13,8 por ciento de los animales analizados no tuvo contacto con esta especie, por el contrario el 78 por ciento de las muestras de rumiantes

salvajes se tomaron en zonas con densidades bajas de esta especie de vector.

En cuanto a la abundancia anual del resto de especies de culicoides, el 68 por ciento de los animales presentaron contacto con *C. pulicaris*, el 33,8 por ciento con *C. nubeculosus*, siendo este porcentaje del 88,9 por ciento en el caso de *C. obsoletus*. Ninguno de los animales muestreados presentó contacto con *C. dewulfii*.

Los resultados indican una mayor prevalencia serológica en aquellos individuos que estuvieron en contacto con densidades anuales de *Culicoides* bajas, (38,5), medias (28,4%) y altas (38,5%), en comparación con la ausencia del vector (10,6%) ($\chi^2=38$; $p<0,001$). También se encontraron frecuencias de seropositividad del 39 por ciento en individuos que compartieron hábitat con densidades altas de *C. imicola* descendiendo estas progresivamente hasta el 8,3 por ciento en ausencia de esta especie, apreciándose diferencias significativas entre las categorías ($\chi^2=69,8$; $p<0,001$).

Variable	Categoría	Total	%
Total Culicoides	Ausencia	113	7,4
	Baja	393	25,8
	Media	555	36,4
	Alta	465	30,5
C. imicola	Ausencia	145	9,5
	Baja	513	33,6
	Media	409	26,8
	Alta	459	30,1
Complejo obsoletus	Ausencia	211	13,8
	Baja	1133	74,2
	Media	181	11,9
	Alta	1	0,1
C. obsoletus	Ausencia	1356	88,9
	Baja	170	11,1
C. scoticus	Ausencia	1522	99,7
	Baja	4	0,3
C. pulicaris	Ausencia	489	32,0
	Baja	926	60,7
	Media	88	5,8
	Alta	23	1,5
C. nubeculosus	Ausencia	1011	66,3
	Baja	427	28,0
	Media	64	4,2
	Alta	24	1,6
C. dewulfii	Ausencia	1526	100,0

Tabla RD22. Distribución de frecuencias de las variables asociadas a la abundancia anual de vectores del género *Culicoides*

En el caso de las especies del Complejo *obsoletus*, se apreciaron seroprevalencias del 34,6 por ciento con

abundancia baja de esta especie en relación a la abundancia media (13,8%) y ausencia (19%) ($\chi^2=46,7$; $p<0,001$).

Variable	Categoría	Total	+	%	Valor	gl	p
Total Culicoides	Ausencia	113	12	10,6	38	3	<0,001
	Baja	393	108	27,5			
	Media	555	158	28,4			
	Alta	465	179	38,5			
C. imicola	Ausencia	145	12	8,3	69,8	3	<0,001
	Baja	513	118	23,0			
	Media	409	148	36,2			
	Alta	459	179	39,0			
Complejo obsoletus	Ausencia	211	40	19,0	46,7	3	<0,001
	Baja	1133	392	34,6			
	Media	181	25	13,8			
	Alta	1	0	0,0			
C. obsoletus	Ausencia	1356	407	30,0	0,3	1	0,871
	Baja	170	50	29,4			
C. scoticus	Ausencia	1522	457	29,9	-	-	-
	Baja	4	0	0,0			
C. pulicaris	Ausencia	489	132	27,0	33,8	3	0,009
	Baja	926	314	33,9			
	Media	88	5	5,7			
	Alta	23	6	26,1			
C. nubeculosus	Ausencia	1011	272	26,9	54,9	3	<0,001
	Baja	427	131	30,7			
	Media	64	45	70,3			
	Alta	24	9	37,5			
C. dewulfii	Ausencia	1526	457	29,9	-	-	-

Tabla RD23. Tabla de contingencia para las variables asociadas a la abundancia anual de vectores del género Culicoides

La variable abundancia anual de *C. pullicaris* mostró diferencias entre sus categorías ($\chi^2=33,8$; $p=0,009$) observándose valores de seropositividad menores con densidades medias (5,7%) y más elevados (33,9%) en zonas con densidades bajas de esta especie. La seropositividad de los animales analizados osciló entre 70,3 y el 26,9 por ciento en zonas con abundancias anuales medias o ausencia de *C. nubeculosus*, respectivamente, apreciándose diferencias entre sus categorías ($\chi^2=54,9$; $p<0,001$). La frecuencia de seropositivos fue muy similar en zonas sin presencia de *C. obsoletus* (30,0%) o en aquellas que presentaron densidades bajas de esta especie (29,4%) ($\chi^2=0,3$; $p=0,871$).

Las variables *C. scoticus anual* y *C. dewulfii anual* no fueron incluidas en el estudio bivalente al presentar alguna de sus categorías frecuencias superiores al 95 por ciento.

Los resultados obtenidos señalan prevalencias más elevadas en los individuos muestreados expuestos a las variables anuales del vector, respecto de las mensuales. Estos resultados son lógicos si tenemos en cuenta que existe un mayor riesgo de contacto entre los rumiantes y el vector a lo largo de un año que durante un mes.

5.2.2. Análisis de correlaciones múltiples.

Con el objetivo de establecer la colinealidad existente entre las diferentes variables independientes que mostraron asociación ($P< 0,05$) con la variable dependiente en el

análisis bivalente, se llevó a cabo un análisis de colinealidad. A partir de las variables independientes que presentaron colinealidad entre ellas ($p < 0,05$ y $r > 0,4$), se seleccionaron aquellas variables con mayor plausibilidad biológica en relación a la variable dependiente.

5.2.3. Análisis multivariante.

Tras la comprobación de la colinealidad, las variables incluidas para el análisis de regresión logística fueron las siguientes: *temporada de caza, estación del año, región, especie, edad, densidad de silvestres, aguas estancadas, bebederos, presencia de ciervo, presencia de muflón, presencia de bovino, C. imicola mensual, C. imicola anual, C. nubeculosus mensual.*

El análisis de regresión determinó que las principales variables potencialmente asociadas con la seropositividad del VLA en las poblaciones de ungulados silvestres en el sur de España fueron (tabla RD 24) *Especie, Densidad de silvestres, Edad, Abundancia anual de C. Imicola y Aguas estancadas.*

En efecto, la primera variable que incluyó el modelo fue la *especie*. La seropositividad frente al VLA fue significativamente superior en ciervo (OR=11,04; $p=0,001$) y gamo (OR=4,63; $p=0,043$) en comparación con la cabra montés. En este sentido, las seroprevalencias obtenidas en ciervo y gamo ascendieron al 39,5 y 28,9 por ciento,

respectivamente. Sin embargo todos los estudios realizados en fauna silvestres aportan prevalencias basadas en la técnica ELISA, y únicamente Falconi y cols. (2012) confirman la circulación de serotipos mediante SNV, no aportando prevalencias mediante el uso de esa técnica.

Variables	Categorías	OR	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para Exp (B)	
					Inferior	Superior
Especie	Cabra m.	-	-	-	-	-
	Ciervo	2,402	0,001	11,044	2,583	47,222
	Corzo	-1,023	0,334	0,359	0,045	2,863
	Gamo	1,533	0,043	4,633	1,051	20,421
	Muflón	1,393	0,072	4,028	0,884	18,351
Edad	Joven	-	-	-	-	-
	Subadulto	0,284	0,353	1,329	0,730	2,419
	Adulto	1,059	0,000	2,883	1,662	5,002
Densidad de silvestres	Baja	-	-	-	-	-
	Media	1,092	0,009	2,981	1,306	6,803
	Alta	2,558	0,000	12,906	5,761	28,915
Aguas estancadas	No	-	-	-	-	-
	Sí	0,757	0,002	2,133	1,332	3,415
Densidad C. Imicola anual	Ausencia	-	-	-	-	-
	Media	0,674	0,000	1,961	1,362	2,825
	Alta	0,906	0,000	2,473	1,729	3,538

Tabla RD24. Variables significativas asociadas a la presencia de anticuerpos frente al VLA mediante análisis de regresión logística multivariante. En negrita valores significativos.

En este sentido, entre 2005 y 2007, Ruiz-Fons y cols. (2008) detectaron una prevalencia de anticuerpos frente al VLA del 22 por ciento en ciervo (309/1409), mientras que García y cols. (2009) encontraron unos datos para esta

especie en el sur de España del 66 por ciento (65/98) durante los años 2006 y 2007. En un estudio llevado a cabo en julio de 2007 en una granja de ciervos situada en la provincia de Cádiz, se encontró una prevalencia de individuos seropositivos que alcanzó el 57,6 por ciento (504/875) (Rodríguez-Sánchez y cols., 2010). Los porcentajes más bajos reportados en España para esta especie, han sido descritos en el centro de la península con un 12,9 por ciento (371/2885), entre 2005-2010 (Falconi y cols., 2012).

Las investigaciones llevadas a cabo en Europa confirman también la elevada circulación del VLA en las poblaciones de ciervo, con seroprevalencias que oscilaron entre el 25,3 (249/982) y el 29,8 por ciento (423/1420) en Bélgica durante el periodo 2006 a 2008 (Linden y cols., 2008; Linden y cols., 2010). En Francia, en el periodo 2008 a 2010, Corbiere y cols. (2012) registraron una seroprevalencia del 50,2 por ciento. En este mismo país se encontraron frecuencias del 30,3% por ciento (254/837) en el periodo 2008-2009 (Rossi y cols., 2013).

En el caso del gamo, los resultados obtenidos fueron menores que los descritos previamente por otros estudios en España, que oscilaron entre el 35 y el 50 por ciento, en el centro (34/96) y sur de España (10/20), respectivamente (Ruiz-Fons y cols., 2008; García y cols., 2009). Sin embargo, en otros países europeos como Italia, De Curtis y cols. (2007) encontraron una baja seroprevalencia (0,5%) en los 206

gamos analizados.

Los resultados observados en nuestras investigaciones sugieren la mayor susceptibilidad del ciervo y el gamo a la infección por el VLA. En estudios de infecciones experimentales realizados en ciervo, se muestran elevados títulos de anticuerpos frente al virus durante, como mínimo, el primer mes postinfección (López-Olvera y cols., 2010; Lorca-Oró y cols., 2012). Teniendo en cuenta las agregaciones espaciales de estas especies durante los meses de otoño como consecuencia del celo, así como las elevadas concentraciones de vectores competentes presentes en esa época, la etología de estos dos cérvidos podría también estar directamente implicada en las mayores seroprevalencias encontradas en estas especies.

El resto de especies incluidas en el estudio no presentaron una asociación significativa con la positividad frente al VLA. En el caso del muflón, nuestros resultados serológicos (26,8%) se encuentran en niveles similares a los descritos previamente por García y cols. (2009) que señalaron un 33 por ciento (3/9) en la misma zona, siendo superiores al 13 por ciento (9/68) encontrado por Ruiz-Fons y cols. (2008) en el centro de España. En un estudio llevado a cabo en Francia entre 2008 y 2010 ninguno de los 64 muflones analizados tuvo contacto con el VLA (0/64) (Corbiere y cols., 2012). La mayor sensibilidad del muflón a la infección por el VLA (Fernández-Pacheco y cols., 2008),

sugiere que una proporción de los animales que sufren la infección acabarían muriendo como consecuencia de ello, las seroprevalencias obtenidas podrían estar subestimadas, al existir una menor proporción de animales infectados que hayan superado la enfermedad (Rodríguez-Sánchez y cols., 2010).

La baja seroprevalencia detectada en corzo concuerda con los estudios llevados a cabo previamente en Francia, Bélgica y España, donde se encontraron porcentajes siempre inferiores al 5 por ciento (Ruiz-Fons y cols., 2008; Rossi y cols., 2009; Linden y cols., 2010; Boadella y cols., 2010; Corbiere y cols., 2012).

En el mismo sentido, la cabra montés tampoco ha mostrado en nuestro estudio una seroprevalencia elevada, coincidiendo con las diferentes investigaciones realizadas previamente en esta especie, con porcentajes de seropositividad que oscilaron entre el 4 y el 11 por ciento (García y cols., 2009; Santiago-Moreno y cols., 2010; Lorca-Oró y cols., 2011). Estudios realizados en poblaciones de íbice alpino (*Capra ibex*), especie muy relacionada filogenéticamente y de hábitos similares a la cabra montés, tampoco se ha encontrado una elevada (1,6%; 2/128) circulación del VLA (Rossi y cols., 2009).

La segunda variable introducida en el modelo fue *Densidad de silvestres*. Los individuos procedentes de zonas con elevadas y medias densidades de rumiantes silvestres

presentaron 12,9 ($p=0,000$) y 3,0 ($p=0,009$) más probabilidades de presentar anticuerpos frente al VLA que los animales abatidos en zonas de bajas densidades, respectivamente. La presencia de esta variable en el modelo multivariante indica que las densidades medias y altas de ungulados silvestres están directamente asociadas con la mayor circulación del VLA entre sus poblaciones.

Nuestros resultados coinciden con los previamente observados por nuestro grupo (Allepuz y cols., 2010) en rumiantes domésticos en esta zona de estudio. Así mismo, diversas investigaciones llevadas a cabo en fauna salvaje han puesto de manifiesto que las elevadas densidades de estas especies favorecen la aparición de enfermedades infecciosas, incluidas la LA (Acevedo y cols., 2007; Gortázar y cols., 2012). En este sentido, Pelosse y cols. (2012) confirmaron que la presencia de enfermedades transmitidas por vectores es mayor cuando las densidades de hospedadores susceptibles son elevadas.

La existencia de un gran número de animales por unidad de superficie hace que frecuentemente se produzcan agregaciones entre ellos, siendo las horas crepusculares y nocturnas las más propicias para la actividad de las especies silvestres y de los vectores competentes. En el sur de España, donde los veranos son secos y calurosos, las agregaciones espaciales de ungulados silvestres suelen producirse en zonas en las que el agua se mantiene durante

esta época del año. Además, las zonas húmedas y las suaves temperaturas en las horas crepusculares de los meses de verano y otoño, favorecen la presencia de los culicoides, dándose las condiciones idóneas para la transmisión del VLA entre los vectores infectados y los hospedadores susceptibles.

Igualmente, el periodo de celo de la mayoría de los rumiantes silvestres ocurre durante el otoño (excepto el corzo, que es en verano), que suele ser muy templado en Andalucía, por lo que la agregación puede adyugar al aumento de densidad y por tanto a la transmisión.

El modelo incorporó también la variable *edad* como un factor potencialmente asociado con la seropositividad frente al VLA, que se incrementó significativamente con la edad de los animales. Los individuos adultos presentaron un riesgo significativamente mayor (OR=2,8; $p=0,000$) de ser seropositivos frente al VLA comparado con los jóvenes. Nuestros resultados son consistentes con los previamente publicados y confirman que el riesgo de entrar en contacto con el virus incrementa a lo largo de la vida (Ruiz-fons y cols., 2008; García y cols. 2009; García-Bocanegra y cols., 2011; Rossi y cols, 2013). Tan solo Falconi y cols. (2012) describieron seroprevalencias significativamente mayores en animales jóvenes que en adultos.

La variable *C. imicola anual* fue incluido en el modelo como un potencial factor implicado en la epidemiología de la

LA en poblaciones de ungulados silvestres. Las poblaciones que fueron muestreadas en zonas donde se encontraron densidades anuales de *C. imicola* medias (OR=1,96; $p=0,000$) y altas (OR=2,47; $p=0,000$), presentaron un número significativamente mayor de animales seropositivos, respecto a las áreas de nula o baja densidad anual de *C. imicola*.

La especie *C. imicola* se ha mostrado en los últimos años como la de mayor distribución y abundancia en el sur de la península ibérica (Calvete y cols., 2008; Pérez y cols., 2012). Diversas investigaciones han puesto de manifiesto las elevadas densidades de esta especie en diferentes zonas de España, incluida Andalucía (Calvete y cols., 2008; Acevedo y cols., 2010). No obstante, nuestro análisis ha supuesto el primero que correlaciona positivamente la seroprevalencia en poblaciones de ungulados silvestres y la abundancia de *C. imicola*. Aunque otras especies de culicoides incluidas en el estudio pueden ser competentes para transmitir el VLA, las densidades de vectores medias y altas, parecen ser determinantes para la presencia de un mayor número de animales seropositivos.

Finalmente, el modelo incorporó la variable presencia de *aguas estancadas* como un factor de riesgo implicado en presencia de la LA en las poblaciones de ungulados silvestres en Andalucía. Así, los animales que habitan en zonas con aguas estancadas presentaron un

riesgo 2,13 ($p=0,002$) veces mayor de ser seropositivos. Los resultados obtenidos pueden asociarse a que la presencia de aguas estancadas (charcas, bebederos, pantanetas, etc), suponen puntos de agregación espacial de los ungulados silvestres, especialmente durante los meses de verano. Resultados similares han sido descritos por Vicente y cols. (2007), que indica que los puntos de agua estancada son uno de los factores de riesgo determinantes para la presencia de tuberculosis en los ciervos.

Así mismo, la presencia de los puntos de agua estancada, favorecen la mayor concentración de vectores competentes en esas zonas ya que se trata de zonas idóneas de cría para estas especies, lo que puede explicar los resultados obtenidos en nuestro estudio.

5.2.4. Árbol de decisión CHAID

En base a los factores de riesgo obtenidos en el análisis multivariante se ha elaborado un árbol de decisión CHAID, que tiene en cuenta los valores de χ^2 de cada una de las variables seleccionadas en el análisis multivariante en relación con la variable dependiente.

Este análisis nos muestra que los ciervos adultos que habitan en zonas con elevadas densidades poblacionales y de *C. imicola*, presentan un mayor riesgo de infectarse con el VLA; esto ocurre con tres de cada cuatro (72,4%) individuos que cumplieron estas condiciones.

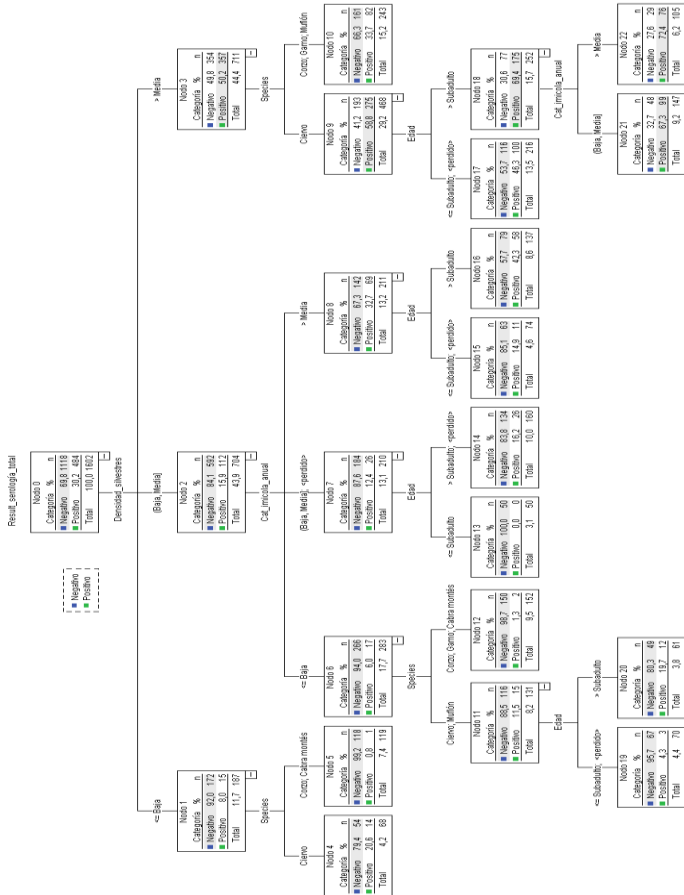


Gráfico RD2. Árbol de decisión CHAID

Por el contrario, las poblaciones de corzo y cabra montés que se localizan en zonas de baja densidad de rumiantes silvestres, presentaron una menor exposición a la infección por el VLA, habiéndose afectado sólo el 0,8 por ciento de los animales muestreados.

5.2.5. Plan de lucha

El modelo multivariante y los árboles de decisión obtenidos nos indican que los individuos de edad adulta, principalmente ciervos y gamos, que habitan en zonas con una elevada densidad de rumiantes silvestres, donde existe alta abundancia de *C. imicola* y la presencia de aguas estancadas, presentaron las mayores probabilidades de infección por el VLA.

Por tanto, las bases de nuestro programa de lucha frente a la circulación del VLA se fundamentarán en las actuaciones sobre estos factores de riesgo. Puesto que los factores de riesgo son aquellas variables que cuando están presentes en un ecosistema aumentan significativamente la probabilidad de aparición de una infección o enfermedad, el control los factores determinados en nuestro estudio deberían hacer disminuir la circulación del VLA en las poblaciones de rumiantes silvestres en el sur de España.

Evidentemente no podemos luchar contra la susceptibilidad de determinadas especies silvestres al VLA, pero debemos centrar nuestra lucha frente a las elevadas

densidades de animales, de vectores y el control de las zonas de cría de los vectores.

Las elevadas densidades de animales silvestres pueden presentar una influencia negativa en el coto atendiendo diferentes puntos de vista como la presencia de otras enfermedades, el daño causado a la vegetación, así como el propio bienestar de los animales. Considerando estos condicionantes, así como los resultados obtenidos, se hace necesario el control adecuado de las densidades poblacionales de ungulados silvestres en los cotos de nuestra región. Así mismo, es imperativa la realización de estudios que determinen densidades adecuadas de animales silvestres en nuestra zona, ya que los datos disponibles alcanzan unas cifras elevadísimas en comparación con otras regiones, y la adecuación a la capacidad de acogida del medio.

Las zonas donde se hayan detectado elevados recuentos anuales de *C. imicola* deberían ser tratadas sistemáticamente con insecticidas (básicamente larvicidas), tanto en sus áreas de cría que deberán ser estrictamente controladas (desección si fuera necesario) como en instalaciones o infraestructuras para la caza.

El uso de piretroides, algunos organofosforados y neonicotinoides, insecticidas de uso frecuente en la lucha contra diferentes arbovirosis, en horas de máxima actividad del vector y en puntos de agua estancada, charcas y en

lugares de concentración de animales, podría ser una medida eficaz.

Finalmente, y pese a que recientes estudios han demostrado la efectividad de la vacunación frente a lengua azul en ciervo y cabra montés, (Lorca-Oró y cols., 2012^a y b), la implementación de un programa de vacunación frente al VLA en animales silvestres no resulta viable en el medio natural, quedando limitada a animales localizados en granjas y núcleos zoológicos. No obstante las campañas de vacunación en el ganado doméstico, en zonas con elevadas densidades de ciervo y gamo, podría favorecer la menor actividad del virus en la zona, limitando, por tanto, la infección en las poblaciones silvestres.

La posible utilización de cebos vacunantes, con vacunas recombinantes expresadas en plantas, aunque todavía requiere una amplia investigación, también podría ser una medida a tener en cuenta.

5.3. Detección molecular de ARN y aislamiento del VLA.

Para la detección genérica y específica de los serotipos de VLA (ver tabla RD25) hemos empleado diversas técnicas moleculares. La rRT-PCR permitió detectar aquellos individuos infectados por VLA; sin embargo, dado que el periodo de viremia parece ser más corto que la persistencia de anticuerpos, los resultados muestran una menor

frecuencia de individuos ARN-positivos frente al VLA.

La prevalencia de infección de VLA en los rumiantes analizados resultó de un 1,5 por ciento (IC₉₅% 0,9-2,1). Al igual que la serología, la prevalencia mayor se obtuvo para el VLA-1 (21 animales positivos), seguido de VLA-4 (un individuo positivo), no detectándose ARN vírico del VLA-8 en las 1.466 muestras analizadas. Estos resultados son lógicos teniendo en cuenta el número de focos detectados para cada serotipo en rumiantes domésticos en la zona de estudio, donde el mayor número de brotes han estado asociados a VLA-1 (4448), seguidos de VLA-4 (329) y VLA-8 (37).

Los resultados confirmaron la circulación del VLA-1 en las poblaciones silvestres, pese a la aparente ausencia de la misma en las especies domésticas, probablemente como consecuencia de la vacunación del ganado. En este sentido, tres de las muestras positivas al VLA-1 mediante técnicas de rRT-PCR fueron tomadas en noviembre de 2009, casi un año después de que se notificara el último brote en ganado doméstico para ese serotipo. Así mismo, uno de los animales detectados como positivo a VLA-1 mediante rRT-PCR, resultó negativo usando ambas técnicas serológicas, lo que podría insinuar una infección reciente en este individuo (Linden y cols., 2010; López-Olvera y cols., 2010). Estos resultados sugieren el mantenimiento de la circulación del virus en las poblaciones de rumiantes silvestres del sur de España.

		Total	rRT- PCR genérica		rRT-PCR específica de serotipo					
					BTv-1		BTv-4		BTv-8	
			+	%	+	%	+	%	+	%
Especies	Ciervo	729	20	2,74	19	2,61	1	0,1	0	0,0
	Corzo	75	0	0	0	0,00	0	0,0	0	0,0
	Gamo	177	0	0,00	0	0,00	0	0,0	0	0,0
	Muflón	105	1	0,95	1	0,95	0	0,0	0	0,0
	Cabra m.	380	1	0,26	1	0,26	0	0,0	0	0,0
	Total	1466	22	1,50	21	1,43	0	0,0	0	0,0
Edad	Adulto	674	13	1,93	12	1,78	1	0,1	0	0,0
	Subadulto	251	6	2,39	6	2,39	0	0,0	0	0,0
	Joven	143	3	2,10	3	2,10	0	0,0	0	0,0
	Total	1068	22	2,06	21	1,97	1	0,1	0	0,0
Sexo	Hembra	532	8	1,50	8	1,50	0	0,0	0	0,0
	Macho	519	14	2,70	13	2,50	1	0,2	0	0,0
	Total	751	22	2,93	21	2,80	1	0,1		0,0
Temporada de caza	2006/2007	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2007/2008	29	4	13,79	4	13,79	0	0,0	0	0,0
	2008/2009	338	1	0,30	1	0,30	0	0,0	0	0,0
	2009/2010	707	3	0,42	3	0,42	0	0,0	0	0,0
	2010/2011	392	14	3,57	13	3,32	1	0,3	0	0,0
	Total	1466	22	1,50	21	1,43	1	0,1	0	0,0
Provincia	Almería	24	0	0,00	0	0,00	0	0,0	0	0,0
	Cádiz	303	4	1,32	3	0,99	1	0,3	0	0,0
	Córdoba	183	2	1,09	2	1,09	0	0,0	0	0,0
	Granada	179	0	0,00	0	0,00	0	0,0	0	0,0
	Huelva	136	0	0,00	0	0,00	0	0,0	0	0,0
	Jaén	254	11	4,33	11	4,33	0	0,0	0	0,0
	Málaga	301	2	0,66	2	0,66	0	0,0	0	0,0
	Sevilla	86	3	3,49	3	3,49	0	0,0	0	0,0
Total	1466	22	1,50	21	1,43	1	0,1	0	0,0	

Tabla RD25. Resultados de detección de ARN genérica y por serotipos

Algunas muestras positivas a RT-PCR específica para el VLA-1 (12/22) fueron obtenidas en áreas geográficas en

las que no se detectó circulación de este serotipo en el ganado doméstico (RASVE, 2013), lo que refuerza la hipótesis de la relevancia de los rumiantes silvestres en la difusión de la LA en los ecosistemas mediterráneos. Así mismo, ARN del VLA-4 fue detectado en un ciervo muestreado en noviembre de 2010, menos de un mes después de que la reemergencia de este serotipo fuera confirmada en una granja centinela situada a menos de 60 km de distancia. Los resultados obtenidos confirman la utilidad de estas especies para la vigilancia epidemiológica del VLA, sobre todo en zonas con programas de vacunación en domésticos.

Los resultados obtenidos confirman la susceptibilidad del ciervo (2,74%), muflón (0,93%) y cabra montés (0,26%) a la infección con el VLA, pudiendo jugar estas especies un papel importante en la epidemiología de la enfermedad actuando como reservorio del virus (Fernández-Pacheco y cols., 2008; Rodríguez-Sánchez y cols., 2010; Corbière y cols., 2012; Falconi y cols., 2012). Pese a las elevadas seroprevalencias obtenidas en gamo, no se detectó ARN en ninguno de los ejemplares incluidos en el estudio. Igualmente, todos los corzos analizados mediante rRT-PCR resultaron negativos.

Aunque estudios previos ya habían puesto de manifiesto la presencia de ARN del VLA en ciervos en cautividad (Ruiz-Fons y cols., 2010), los resultados de

nuestro estudio ha supuesto también, la primera descripción de ARN de los serotipos 1 y 4 en ciervos de vida libre en España.

En Francia, el VLA-1 fue detectado en ciervo (Corbière y cols., 2012), mientras que animales infectados por VLA-8 fueron igualmente identificados en Bélgica (Linden y cols., 2010). En España, el VLA-8 nunca ha sido detectado en fauna salvaje, posiblemente como consecuencia de la limitada circulación de este serotipo en este país (RASVE, 2013).

En cuanto al muflón, la presencia del VLA-1 y VLA-4 ha sido previamente descrita en animales clínicamente afectados procedentes del sur de España (Fernández-Pacheco y cols., 2008; Rodríguez-Sánchez y cols., 2010). En este sentido, ambos estudios ponen de manifiesto que la LA afecta al muflón de forma muy similar que a la oveja doméstica, sugiriendo que el bajo número de muflones positivos a la detección del ARN del VLA obtenido en nuestro estudio puede relacionarse con que los individuos abatidos no presentaron una infección activa.

En el resto de especies analizadas, la presencia de ARN del VLA-1 ha sido previamente detectada en cabra montés y corzo en España y Francia, respectivamente (Lorca-Oró y cols. 2011; Corbière y cols., 2012). Sin embargo, no se han detectado gamos infectados (presencia de ARN vírico) hasta la fecha, a pesar de las altas seroprevalencias encontradas en esta especie, lo que podría estar asociado a una viremia

más corta en comparación con otras especies de ungulados, no existiendo estudios experimentales de infección por VLA llevados a cabo en este cérvido.

Tampoco se observaron diferencias entre los distintos grupos de edad, oscilando entre el 1,93 por ciento en individuos adultos y el 2,39 por ciento de los subadultos. Así mismo la presencia de ARN del virus observada en animales jóvenes señala una infección reciente confirmando la existencia de circulación del virus durante ese año. Considerando el sexo de los animales, se aprecia mayor porcentaje de machos positivos (2,70%) en comparación con las hembras (1,50%), si bien, estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p=0,175$).

Atendiendo a las temporadas cinegéticas, durante el periodo 2007/2008 se observaron las mayores prevalencias (13,79%), descendiendo la temporada siguiente al 0,30 por ciento para ir aumentando progresivamente hasta el 3,57 por ciento en la temporada 2010/2011. Los resultados concuerdan con el mayor número de brotes detectado en animales domésticos durante el año 2007, asociado a la mayor circulación del virus durante ese año. El incremento de la prevalencia en el periodo 2010/2011 podría indicar una circulación más activa en los últimos años pese a las campañas de vacunación en domésticos. Como consecuencia, existe un riesgo evidente de transmisión del virus desde los rumiantes salvajes a los domésticos, por lo

que consideramos necesario confirmar la ausencia de circulación del virus también en silvestres antes de cesar el programa de vacunación.

La distribución geográfica de los animales infectados no fue homogénea, oscilando entre el 4,3 de Jaén y el 0,66% de Málaga, no describiéndose casos positivos en las provincias de Almería, Granada y Huelva. Sin embargo, se han detectado presencia de ARN en animales de zonas donde ningún brote había sido notificado en el ganado doméstico, confirmándose la circulación del virus en estas zonas (García y cols., 2009; Lorca-Oró y cols., 2011).

Los bajos valores de los ciclos de amplificación (CT) de la rRT-PCR obtenidos en algunos de los individuos muestreados (CT<35) indican elevadas cargas virales en estos animales.

En un total de 13 individuos positivos a la detección de ARN mediante rRT-PCR (11 ciervos y 1 muflón para VLA-1; 1 ciervo para VLA-4) se consiguió aislar el virus mediando inoculación en línea celular KC. Los aislamientos de VLA-1 y VLA-4 obtenidos en ciervo naturalmente infectado, suponen los primeros llevados a cabo en esta especie para ambos serotipos. Así mismo, aunque Fernández-Pacheco y cols. (2010) consiguieron aislar VLA-4 a partir de muflones muertos, nuestro estudio supone el primer aislamiento de VLA-1 en esta especie. Las elevadas cargas virales unidas al aislamiento del virus, indican que estas dos especies podrían

estar jugando un papel importante en el ciclo epidemiológico de la enfermedad en el sur de España, actuando como reservorio potencial del virus.

5.4. Estudio de la abundancia y distribución de *Culicoides* spp. en el sur de España.

En este apartado se describe la distribución y abundancia de diferentes especies de *Culicoides* en la Comunidad Autónoma de Andalucía entre 2007 y 2011. Tanto el número como la ubicación de las diferentes estaciones de captura fueron previamente establecidos (Mapa M2) tal y como queda recogido en el programa de Vigilancia Entomológica de la Lengua Azul en Andalucía (CAPMA).

Se situaron 45 puntos de muestreo homogéneamente distribuidos en Andalucía, presentándose una densidad de una trampa cada 1.897 Km². En otros estudios realizados previamente en Andalucía, se realizaron densidades de trampeo menores a las del presente estudio. Así, Ortega y cols. (1999), proporcionaron resultados en la parte oriental de Andalucía a partir de una trampa cada 807 Km². Igualmente Ortega y cols. (1998) presentaron una distribución de los puntos de trampeo con densidades de una trampa cada 10.939 Km², situadas en provincias del centro y sur de España. Densidades de muestreo más similares a las de nuestro estudio fueron proporcionadas por Pérez y cols. (2012), con una trampa cada 1.479 Km² en todo

el territorio andaluz.

Por otro lado, la eficiencia del tipo de trampa de captura utilizada puede condicionar la detección de los culicoides. En el presente estudio se utilizaron trampas tipo “*Mini-CDC light traps*”, que presentan una elevada especificidad ya que están generalmente orientadas para la captura de culicoides con un filtro de 0,5 mm, limitando la recogida de artrópodos de mayor tamaño (Venter y cols., 2009). Este tipo de trampa es una de las más utilizadas en España y otros países europeos como Portugal o Bélgica, así como en Norteamérica (Capela y cols., 1993; De Dekken y cols., 2008; Smith y Mullens, 2003). La trampa Mini-CDC presenta una elevada eficacia (entre 37-89% más) en comparación con otros tipos de trampas como las Rieb, las Pirbright o las BG-sentinel. Sin embargo, los estudio llevados a cabo por Venter y cols., (2009) indican una eficiencia menor en la captura de culicoides empleando trampa Mini-CDC comparada con las trampas tipo Onderstepoort. Estas diferencias se deben a la fuente de luz más potente usada por las trampas Onderstepoort, no obstante el gasto energético de estas, su instalación y su coste hacen que presenten una menor operatividad que las CDC (Venter y cols., 2009)

Como consecuencia de la baja densidad de las estaciones de muestreo y de la eficacia de las trampas utilizadas, somos conscientes de que tanto la abundancia

como la detección de las especies podrían estar subestimadas.

En cuanto al periodo de estudio, nuestro trabajo resulta el más extenso de los llevados a cabo en Andalucía, con una duración total de 51 meses, comprendiendo el periodo de agosto de 2007 hasta octubre de 2011.

Especie	nº de capturas	Porcentaje
<i>C. imicola</i>	107.320	87,28
<i>Compl. obsoletus</i>	6.487	5,28
<i>C. dewulfii</i>	17	0,01
<i>C. obsoletus</i>	62	0,05
<i>C. scoticus</i>	50	0,04
<i>C. pulicaris</i>	3.411	2,77
<i>C. nubeculosus</i>	5.610	4,56
Total Culicoides	122.957	100

Tabla RD26. Recuento total de las diferentes especies del género *Culicoides* en Andalucía según los años de estudio

Durante el periodo de estudio, el recuento total (RT) de culicoides capturados e identificados ascendió a 122.957 (tabla RD26). *C. imicola* fue la especie con recuentos más elevados, suponiendo más del 87,3 por ciento del total de capturas. Los mosquitos del Complejo *obsoletus* (5,3%) seguidos de *C. nubeculosus* (4,6%) y *C. pulicaris* (2,8%) han presentado también recuentos reseñables. El resto de especies presentaron porcentajes inferiores al 0,5 por ciento del total de capturas.

Se ha utilizado el porcentaje de trampeos positivos (PTP) para valorar la presencia-ausencia de culicoides o de alguna de sus especies según la época del año, independientemente de la densidad de los mismos (tabla RD27). Los resultados obtenidos confirman un 25,3 por ciento de puntos de captura positivos respecto al total muestreado.

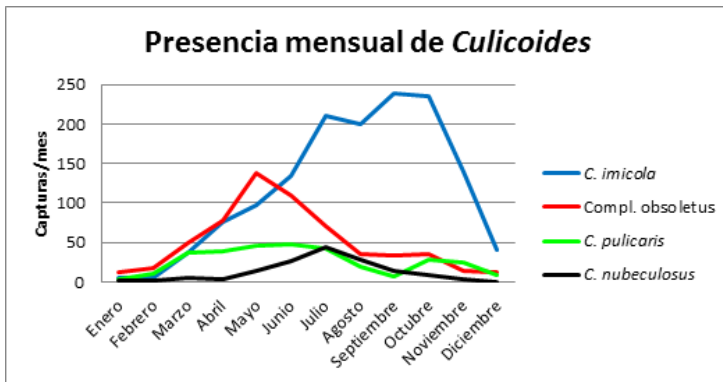
Especie	PTP												Total
	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	
<i>C. imicola</i>	1,2	1,2	5,8	11,7	15,6	20,8	32,8	35,6	36,1	34,4	23,9	7,2	19,6
<i>Compl. obsoletus</i>	2,5	3,4	7,4	12,0	22,0	17,1	11,0	6,4	5,2	5,2	2,6	2,3	8,4
<i>C. dewulfii</i>	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,2	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
<i>C. scoticus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>C. obsoletus</i>	0,0	0,4	0,2	0,5	0,8	0,6	0,2	0,0	0,0	0,3	0,3	0,2	0,3
<i>C. pulicaris</i>	0,6	2,0	5,8	6,0	7,3	7,3	6,7	3,4	1,1	4,1	4,3	1,4	4,3
<i>C. nubeculosus</i>	0,2	0,4	0,8	0,5	2,2	4,2	6,8	5,0	2,3	1,2	0,7	0,0	2,1
Presencia total	3,9	5,4	14,5	20,9	30,4	32,3	38,2	37,7	37,4	38,1	24,8	9,2	25,3
Total de muestreos	485	497	660	650	628	644	644	562	660	687	581	566	7264

Tabla RD27. Porcentaje de trampeos positivos (PTP) total y para cada especie según mes

C. imicola fue la especie con mayor porcentaje de PTP (19,6%), siendo especialmente elevados durante los meses de julio a octubre. Estos resultados coinciden con los obtenidos en diferentes estudios en España (Rawlings y cols., 1997; Ortega y cols, 1998; Wittmann y cols., 2001).

Los mayores PTP obtenidos para culicoides del

Complejo *obsoletus*, se encontraron durante los meses de abril y mayo. Así mismo, las especies de este grupo mostraron mayor presencia que *C. imicola* entre los meses de enero a mayo (gráfica RD3). Los resultados obtenidos confirman una mayor adaptación de culicoides del Complejo *obsoletus* a temperaturas inferiores, tal y como ha sido descrito previamente en otras investigaciones (Ortega y cols., 1998; Miranda y cols., 2004).



Gráfica RD3. Presencia mensual de diferentes especies de culicoides entre 2007 y 2011

La especie *C. pulicaris* presentó PTP homogéneos (4,31%) desde marzo hasta julio descendiendo en los meses estivales e invernales. Por otra parte, los PTP de *C. nubeculosus* alcanzaron valores del 2,08 por ciento de los

muestreos, presentándose al igual que *C. imicola*, mayores porcentajes en los meses de verano, alcanzando en julio el 6,83 por ciento. Las otras especies incluidas en el estudio no se han presentado de manera frecuente por lo que no puede establecerse un patrón claro de presencia mensual para estas, como puede observarse en la tabla RD27.

La presencia constante de vectores del Complejo *obsoletus*, *C. imicola*, *C. pulicaris* y *C. nubeculosus* durante los meses invernales sugiere que estas especies podrían favorecer el *overwintering* del VLA. No obstante, la abundancia con que las citadas especies se presentan, también debería ser tenida en cuenta a la hora de considerar su implicación en el mantenimiento del virus en la zona.

Aunque el RT ha sido muy utilizado para la descripción de la abundancia de culicoides, resulta a veces una herramienta poco exacta a la hora de establecer este parámetro ya que la presión de muestreo puede variar entre las diferentes regiones y épocas del año. Del mismo modo el PTP sólo nos indica si una especie se encuentra presente en una determinada zona o época del año, no aportando valores cuantitativos.

Por este motivo, para llevar a cabo la comparación entre los datos de las diferentes localizaciones y años, se estimaron diferentes indicadores como la *Densidad de culicoides por trampa positiva* (DCTP) o la *Densidad de culicoides total* (DC) (en el que se incluyen también las

trampas negativas), estimadores utilizados previamente en otras investigaciones (Ortega y cols., 1998; Ortega y cols., 1999; Pérez y cols., 2012). Así mismo, la DC fue utilizada para definir el patrón de distribución anual y provincial, así como para realizar la representación gráfica de las especies por comarcas, ya que se consideró que este índice aportaba una mayor precisión.

La tabla RD28 muestra el resultado obtenido para la DCTP, que fue de 66,8 culicoides/trampa (c/tp), valor que se encuentra en concordancia con los datos presentados previamente en esta misma zona (Pérez y cols., 2012). En Andalucía, con este mismo tipo de trampas Pérez y cols. (2012), han descrito índices de capturas por trapeo positivo de 59,8 c/tp. Recuentos medios más elevados (212 c/tp) fueron observados en esta zona utilizando las trampas Pirbright (Ortega y cols., 1998). Así mismo Ortega y cols. (1999) obtuvieron 57 c/tp en la zona oriental de Andalucía, en comparación con los c/tp que han sido observados en nuestro estudio para estas mismas zonas.

Los resultados totales obtenidos para la DC alcanzaron los 16,9 c/t durante el periodo de estudio. Atendiendo al periodo de captura, se puede observar cómo estos fueron aumentando progresivamente en los sucesivos años del estudio, encontrándose la DC más elevada en el año 2011 (tabla RD28).

		DCTP						DC					
		Media	Mediana	Mín	Máx	Percentiles		Media	Mediana	Mín	Máx	Percentiles	
						10	90					10	90
Provincia	Almería	13,5	4	1	90	1,0	40,1	1,3	0	0	90	0,0	0,2
	Cádiz	17,6	5	1	147	1,0	61,5	3,1	0	0	147	0,0	4,0
	Córdoba	56,0	6	1	1370	1,0	138,6	17,7	0	0	1370	0,0	19,0
	Granada	13,0	2	1	580	1,0	18,0	2,3	0	0	580	0,0	1,0
	Huelva	52,5	5	1	1039	1,0	97,4	2,9	0	0	1039	0,0	0,0
	Jaén	116,8	6	1	8800	1,0	126,4	50,3	0	0	8800	0,0	30,0
	Málaga	37,9	6	1	545	1,0	107,6	12,0	0	0	545	0,0	25,0
Sevilla	102,9	12,5	1	1370	1,0	336,2	25,3	0	0	1370	0,0	28,0	
Año	2007	27,4	4	1	214	1,0	89,6	10,6	0	0	214	0,0	20,9
	2008	58,1	5	1	4251	1,0	96,8	14,5	0	0	4251	0,0	11,0
	2009	67,4	6	1	8800	1,0	67,0	15,5	0	0	8800	0,0	8,0
	2010	69,7	5	1	6020	1,0	125,2	18,3	0	0	6020	0,0	11,2
	2011	92,5	5	1	1370	1,0	320,0	26,4	0	0	1370	0,0	16,2
Total	66,8	6	1	8800	1,0	108,0	16,9	0	0	8800	0,0	11,0	

Tabla RD28. Descriptivos de densidad de culicoides por trampa positiva (DCTP) y total (DC)

Los menores valores observados durante el año 2007 podrían estar asociados a que los trameos fueron realizados fundamentalmente en los meses de noviembre y diciembre de ese mismo año. La DC para los años 2008 y 2009 alcanzaron valores próximos a los 15 c/t. A partir del año 2010 la DC aumentó, alcanzando valores de 18 c/t ese año y 26,3 c/t en el año 2011. Estos datos pueden relacionarse con el periodo de abundantes lluvias registradas en otoño e invierno de los años precedentes: 2009 y 2010. El destacado aumento de las precipitaciones provoca que la época de verano sea más húmeda, mejorando considerablemente las condiciones para el desarrollo de los vectores (Meiswinkel, 1996). Aunque durante los meses de

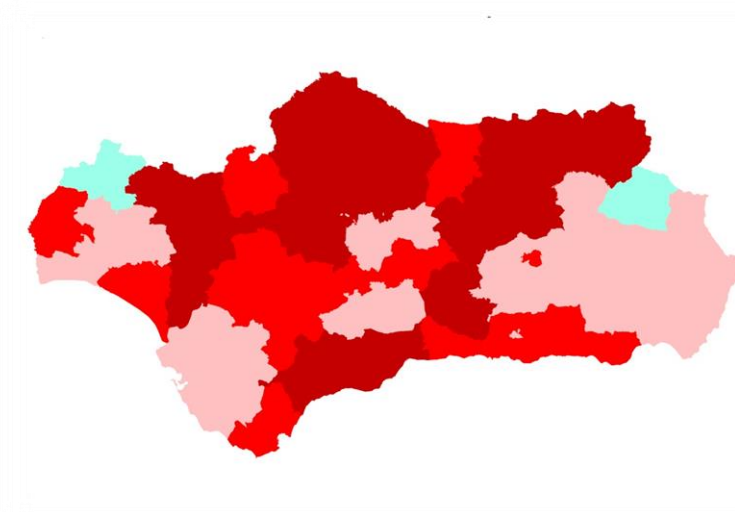
noviembre y diciembre del año 2011 habían cesado las capturas del vector, si estos meses fuesen eliminados para el cálculo de la abundancia en cada uno de los años de muestreo, ésta seguiría siendo mayor durante 2011, en comparación con el resto que presentarían valores inferiores a 21 c/t.

Tal y como se muestra en la tabla RD 28, los resultados de DC mostraron diferencias en la distribución geográfica de culicoides, observándose valores más elevados en la provincia de Jaén (50,34 c/t), seguidos de Córdoba, Málaga y Sevilla, con valores que oscilaron entre los 12,0 y los 25,3 c/t. El resto de provincias de Andalucía presentaron valores inferiores a 4,0 c/t.

Atendiendo a la densidad por especies, *C. imicola* se mostró cómo la especie con valores de DC más elevados (14,8 c/t), constituyendo el 87,6 por ciento del total de capturas realizadas en el estudio (tabla RD 29). Los resultados de la densidad y distribución confirman que *C. imicola* es la especie más frecuente en la zona sur de España (Mellor y cols. 1985; Ortega y cols., 1999; Mellor y Wittmann, 2002; Pérez y cols., 2012). Los mayores valores de DC para *C. imicola* se encontraron en el Valle del Guadalquivir y sus zonas limítrofes (mapa RD2), patrón de abundancia que coincide con el establecido por Ortega y cols. (1999) en el año 1990.

Año	2007	2008	2009	2010	2011	Total
<i>C. imicola</i>	9,80	10,78	16,82	13,95	25,04	14,77
<i>Compl. obsoletus</i>	0,05	1,35	0,71	0,76	0,65	0,89
<i>C. dewulfii</i>	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
<i>C. obsoletus</i>	0,01	0,00	0,00	0,01	0,04	0,01
<i>C. scoticus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,01
<i>C. pulicaris</i>	0,70	0,59	0,39	0,42	0,52	0,47
<i>C. nubeculosus</i>	0,01	1,81	0,43	0,40	0,01	0,77
Total	10,57	14,54	18,36	15,55	26,35	16,93

Tabla RD29. DC por especie y año de muestreo

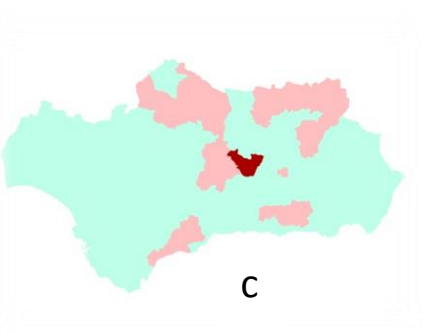
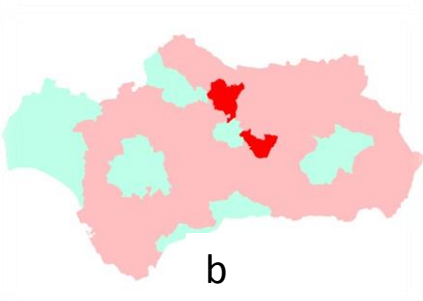
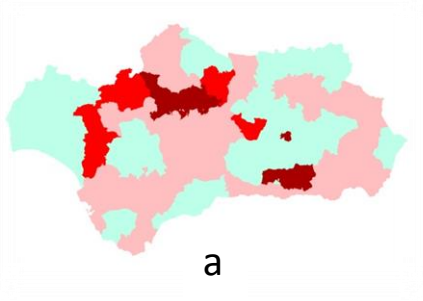


Mapa RD2. Densidad comarcal de *C. imicola* en Andalucía. Se representan las densidades en rosa (bajas), en rojo (medias) y en marrón (altas).

Por otro lado, la elevada abundancia de *C. imicola* observada en zonas como Sierra Morena, Cazorla, la Sierra de Cádiz, el Andévalo o la Serranía de Ronda, coincide, en general, con las mayores densidades poblacionales de rumiantes domésticos y salvajes presentes en Andalucía (Acevedo y cols., 2010).

La densidad media observada para los mosquitos pertenecientes al Complejo *obsoletus* alcanzó valores de 0,89 c/t. Según Calvete y cols. (2008) las especie de este grupo suelen localizarse en zonas con temperaturas medias generalmente más frías. En nuestro estudio, las densidades más elevadas para el Complejo *obsoletus* se han hallado en épocas de temperaturas frías o bien en lugares de una altitud elevada (superiores a los 1000 m. sobre el nivel del mar), una pauta de distribución previamente descrita en las investigaciones de Kauffmann y cols. (2009). El bajo porcentaje de esta especie detectado en el oeste de Andalucía (provincia de Huelva) se encuentra en consonancia con lo descrito en investigaciones realizadas en la zona suroccidental de Portugal, donde la presencia de culicoides del Complejo *obsoletus* no fue hallada en ninguno de los muestreos (Capela y cols., 2003) (Mapa RD 3).

Las especies *C. pulicaris* con 0,47 c/t y *C. nubeculosus* con 0,77 c/t presentan resultados de abundancia ligeramente menores a los del Complejo *obsoletus*, pero sustancialmente mayores que el resto de especies.



Mapa RD3. Densidad comarcal para las especies del Complejo obsoletus (a), *C. pulicaris* (b) y *C. nubeculosus* (c) en Andalucía. Se representan las densidades en rosa (bajas), en rojo (medias) y en marrón (altas).

En el mapa RD3 se puede observar la elevada distribución geográfica de *C. pulicaris* (b), presentando bajas densidades en gran parte del territorio andaluz. Aunque se obtuvieron bajos valores de DC para *C. nubeculosus*, los resultados muestran una amplia distribución geográfica incluyendo algunas zonas del centro de Andalucía con densidades elevadas. Silbermayr (2009) en Austria, describió un patrón muy similar, detectándose la presencia de estas dos especies aunque con bajos índices de abundancia respecto a las especies predominantes (Complejo *obsoletus*).

Las tres especies identificadas del Complejo *obsoletus* han sido *C. dewulfii*, *C. scoticus* y *C. obsoletus*, obteniéndose en todos los casos densidades inferiores a 0,1 c/t. Nuestros resultados indican una escasa abundancia de estas especies en Andalucía. Aunque la presencia de estas tres especies ha sido ya reportada previamente en el sur de la Península Ibérica, su distribución y abundancia resulta más frecuente en zonas del norte de España y en otros lugares del mediterráneo oriental (Savini y cols., 2004; Calvete y cols., 2009; Patakakis y cols., 2009; Romón y cols., 2012; González y cols., 2013).

6. Conclusions/Conclusiones

Conclusions

- 1st. The whole seroprevalence against bluetongue virus from 2006 to 2011 in wild ruminants in Andalusia was 21.9 percent, ranging from 38.9 percent in red deer and 1.8 percent in Spanish ibex. Bluetongue was widespread in wild ruminant population, nevertheless their spatial distribution was not homogeneous because the highest seroprevalences were detected in Central and Western regions.
- 2nd. No antibodies were detected against epizootic hemorrhagic disease in any of the 798 sera analyzed from wild cervids, suggesting the absence of virus circulation in this area during the period studied.
- 3rd. Virus-seroneutralization studies confirm the exposure of wild ruminant to the BTV-1 (18.5%), BTV-4 (15.4%) and BTV-8 (2.1%), showing a spatial dispersion pattern similar to described for livestock.
- 4th. Prevalence of infection of bluetongue by detecting viral RNA was 1.5 percent. The low number of cycles of amplification detected in red deer, mouflon and Spanish ibex, and the virus isolation in cell cultures, strongly confirm the susceptibility of these species to infection.

- 5th. The prevalence found by serology, RT-PCR and cell culture, the detection of infected animals (including young) years after the outbreaks in livestock, as well as the presence of different viral serotypes in regions where there had been not declared in domestic ruminants, clearly indicates that wild ruminants are involved in virus dissemination and persistence, playing a very significant role as reservoirs of bluetongue in the studied ecosystems. We recommend, therefore, the maintenance of livestock vaccination programs until the virus circulation in nature reach undetectable levels.
- 6th. Risk factors potentially involved in the epidemiology of bluetongue in wild ruminants of Mediterranean ecosystems from Southern Spain are: middle-high densities of wild ruminants, species (red deer and fallow deer), adulthood, middle-high abundances *C. imicola* and the presence of stagnant water.
- 7th. Taking together our results, we propose several measures to improving the management and control plans against bluetongue in wild ruminants. Such as the adequacy of the population densities of these species, the control of competent vector and the standing water (because they act as breeding areas for vectors and meeting point for the hosts), as well as domestic livestock vaccination.

- 8th. *Culicoides imicola* is the competent vector of the orbivirus studied showing a higher abundance and distribution in Andalusia, representing 87.3 percent of the total catch. *Culicoides nubeculosus*, *C. pulicaris* and *C. obsoletus* Complex, showed a lesser abundance and density, non-homogeneous and a lower spatial distribution.

Conclusiones

- 1^a. La seroprevalencia frente al virus de la lengua azul durante el período 2006-2011 en rumiantes silvestres en Andalucía fue del 21,9 por ciento, oscilando entre el 38,9 por ciento en ciervo y el 1,8 por ciento en cabra montés. Aunque la lengua azul mostró una amplia difusión en las poblaciones de rumiantes silvestres, su distribución espacial no ha sido homogénea, detectándose las mayores seroprevalencias en las regiones central y occidental de Andalucía.
- 2^a. No se detectaron anticuerpos frente a la enfermedad hemorrágica epizootica en ninguno de los 798 sueros de cérvidos silvestres analizados, lo que sugiere la ausencia de circulación del virus durante el periodo estudiado en esta zona.
- 3^a. Los estudios de seroneutralización confirman la exposición de las diferentes especies de rumiantes silvestres analizadas a los serotipos BTV-1 (18,5%), BTV-4 (15,4%) y BTV-8 (2,1%), mostrando un patrón de dispersión espacial similar al descrito para el ganado.
- 4^a. La prevalencia de infección de la lengua azul mediante la detección del ARN del virus fue del 1,5 por ciento. El escaso número de ciclos de amplificación detectados en ciervo, muflón y cabra montés, así como el aislamiento del virus sobre cultivos celulares, confirman la susceptibilidad de estas especies a la infección.

- 5ª. Los niveles de prevalencia hallados mediante serología, RT-PCR e histocultivo, la detección de individuos infectados (incluyendo animales jóvenes) años después de la detección de brotes en el ganado, así como la presencia de diferentes serotipos víricos en regiones donde no se habían declarado brotes en rumiantes domésticos indica claramente que los rumiantes silvestres están implicados en la diseminación y persistencia del virus jugando un papel significativo como reservorios de la lengua azul en los ecosistemas mediterráneos estudiados. Recomendamos, por tanto, el mantenimiento de los programas de vacunación del ganado hasta que la circulación del virus en los silvestres alcance niveles inapreciables.
- 6ª. Los factores de riesgo potencialmente implicados en la epidemiología de la lengua azul en los rumiantes silvestres de los ecosistemas mediterráneos del sur de España son: densidades medias-elevadas de rumiantes silvestres, especie (ciervo y gamo), edad adulta, abundancias medias-altas de *C. imicola* y presencia de aguas estancadas.
- 7ª. A tenor de los resultados obtenidos proponemos una serie de medidas de manejo encaminadas a la mejora de los planes de gestión y lucha frente a la lengua azul en rumiantes silvestres como son la adecuación de las

densidades poblacionales de estas especies, el control de vectores competentes y de aguas estancadas (como zonas de reproducción de vectores y agregación de hospedadores), así como la vacunación del ganado doméstico.

- 8ª. *Culicoides imicola*, es el vector competente de los orbivirus estudiados que presentó mayor abundancia y distribución en Andalucía, representando el 87,3 por ciento de las capturas totales. *Culicoides nubeculosus*, *Culicoides pulicaris* y culicoides del Complejo *obsoletus*, mostraron una menor abundancia y densidad, así como una distribución espacial escasa y poco homogénea.

7. Bibliografía.

1. Acevedo, P., Vicente, J., Höfle, U., Cassinello, J., Ruiz-Fons, F., Gortazar, C. 2007. Estimation of European wild boar relative abundance and aggregation: a novel method in epidemiological risk assessment. *Epidemiology and Infection* 135(3): 519-527.
2. Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Reyes-García, A.R., Alzaga, V., Gortázar, C. 2008. Estimating red deer abundance in a wide range of management situations in Mediterranean habitats. *Journal of Zoology*, 276: 37-47.
3. Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., Estrada, R., Márquez, A.L., Miranda, M.A., 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).
4. Afshar, A., Thomas, F.C., Wright, P.F., Shapiro, J.L., Anderson, J. 1989. Comparison of competitive ELISA, indirect ELISA and standard AGID tests for detecting blue-tongue virus antibodies in cattle and sheep. *The Veterinary Record* 124(6): 136-141.
5. Afshar, A. 1994. Bluetongue: laboratory diagnosis. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 17(3-4): 221-242.
6. Afshar, A., Heckert, R.A., Dulac, G.C., Trotter, H.C., Myers, D.J. 1995. Application of a competitive ELISA for the detection of bluetongue virus antibodies in llamas and wild ruminants. *Journal of Wildlife Diseases* 31(3): 327-330.
7. Agüero, M., Jiménez-Clavero, M.A., El Harrak, M., Gómez-Tejedor, C. 2008a. Real time RT-PCR method for specific detection of bluetongue virus serotype 1 strain Algeria 2006. Detection of the first BTV-1 outbreak in Spain. In Abstract book of the Bluetongue Satellite Symposium "Bluetongue in Europe, back to the future", Brescia, Italy, Junio de 2008. Abstract 59, pp 16.
8. Agüero, M., Buitrago, D., Gómez-Tejedor, C. 2008b. False-positive results obtained when bluetongue virus serotype 1 Algeria 2006 was analyzed with a reverse transcription-PCR protocol for detection of epizootic hemorrhagic disease virus. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 3173-3174.
9. Akita, G.Y., Ianconescu, M., MacLachlan, N.J., Osburn, B.I. 1994. Bluetongue disease in dogs associated with contaminated vaccine. *Veterinary Record* 134(11): 283-284.
10. Alba, A., Casal, J., Domingo, M. 2004. Possible introduction of bluetongue into the Balearic Islands, Spain, in 2000, via air streams. *Veterinary Record* 155: 460-461.
11. Al-Busaidy, S.M., Mellor, P.S. 1991. Epidemiology of bluetongue and related orbiviruses in the Sultanate of Oman. *Epidemiology and Infection*, 106: 167-178

12. 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., Smale, L., McNutt, J.W., Laurenson, M.K., Mills, M.G.L. & Osburn, B.I. 1994. Evidence of natural bluetongue virus infection among African carnivores. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 51: 568-586.
13. 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(3-4): 263-271.
14. Allison, A.B., Goekjian, G.H., Potgieter, C., Wilson, W., Johnson, D., Mertens, P.P.C., Stallknecht, D. 2010. Detection of a novel reassortant epizootic hemorrhagic disease virus in the United States containing RNA segments derived from both exotic and endemic serotypes. *Journal of General Virology* 91: 430-439
15. Anderson, E. C., Rowe, L. W. 1998. The prevalence of antibody to the viruses of bovine virus diarrhoea, bovine herpes virus 1, rift valley fever, ephemeral fever and bluetongue and to *Leptospira* sp in free-ranging wildlife in Zimbabwe. *Epidemiology and Infection* 121: 441-449.
16. Andrew, M., Whiteley, P., Janardhana, V., Lobato, Z., Gould, A., Coupar, B. 1995. Antigen specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 47: 311-322.
17. Anónimo. 2007. Conclusiones. III Congreso Andaluz de Caza: Caza, Desarrollo Rural y Sostenibilidad Ambiental en la Andalucía del siglo XXI. Córdoba, España, octubre de 2007.
18. Aradaib, J.E., Karrar, A.E., Ibrahim, K.E.E., Osburn, B.I. 1999. Detection of Orbivirus infection. *Sudan Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry* 37: 1-29.
19. Arenas, A., Perea, A. 1993. El ciervo en Sierra Morena. Ed. Servicio de Publicaciones de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Córdoba, pp: 1-161.
20. Arenas, A. J., Gómez, F., Salas, R., Carrasco, P., Borge, C., Maldonado, A., O'Brien, D. J., Martínez-Moreno, F. J. 2002. An evaluation of the application of infrared thermal imaging to the tele-diagnosis of sarcoptic mange in the Spanish ibex (*Capra pyrenaica*). *Veterinary Parasitology* 109: 111-117
21. Arenas, A., Arenas-Montes, A., Perea, A., González García, M.A., Maldonado, J.L. 2008. La Lengua azul y el sector ovino en Andalucía. En: Informe anual del sector agrario en Andalucía 2007. Ed. Fundación Unicaja, Málaga, pp 459-471.
22. Arenas-Montes, A., García-Bocanegra, I., Paniagua, J., Franco, J.J., Miró, F., Fernández-Morente, M., Carbonero, A., Arenas, A. 2013a. Blood sample by puncture in the cavernous sinus from hunted wild boars. *European Journal*

- of wildlife research 59(2): 299-303.
23. Arenas-Montes, A., Arenas, A., García-Bocanegra, I., Mertens, P., Batten, C., Nomikou, K. 2013b. Serosurveillance of orbiviruses in wild cervids from Spain. *Veterinary Record* 172: 508-509.
24. Attoui, H., Mertens, P.P.C., Becnel, J., Belaganahalli, S., Bergoin, M., Brussaard, C.P., Chappell, J.D., Ciarlet, M., del Vas, M., Dermody, T.S. 2011. Orbiviruses, Reoviridae. En: *Virus taxonomy ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. Ed. Elsevier, pp. 592-603.
25. Baldet, T., Delécolle, J.C., Cêtre-Sossah, C., Mathieu, B., Meiswinkel, R., Gerbier, G. 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.
26. Barratt-Boyes, S.M., McLachlan, N.J. 1994. Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves, *Veterinary Microbiology* 40: 361-371.
27. Barros, S.C., Ramos, F., Luís, T.M., Vaz, A., Duarte, M., Henriques, M., Cruz, B., Fevereiro, M. 2007. Molecular epidemiology of bluetongue virus in Portugal during 2004-2006 outbreak. *Veterinary Microbiology* 124: 25-34.
28. Barzilai, E., Tadmor, A., Shimshony, A. 1971. Natural bluetongue infection in the mountain gazelle (*Gazella gazella*). *Refuah Veterinarith*. 28(3): 93-97.
29. Batten, C.A., Harif, B., Henstock, M.R., Ghizlane, S., Edwards, L., Loutfi, C., Oura, C.A., El Harrak, M. 2011. Experimental infection of camels with bluetongue virus. *Research in Veterinary Science* 90(3): 533-535.
30. Benazzou, H. 2006. Outbreak: Epizootic Haemorrhagic Disease in Cattle, Morocco. *International Society for Infectious Disease AN 20061010.2906*
31. Bender, L.C., Li, H., Thomson, B.C., Morrow, P.C., Valdez, R. 2003. Infectious disease survey of Gemsbok in New Mexico. *Journal of Wildlife Diseases* 39: 772-778.
32. Beringer, J., Hansen, L.P., Stallknecht, D.E. 2000. An epizootic of hemorrhagic disease in white-tailed deer in Missouri. *Journal of Wildlife Diseases* 36: 588-591.
33. Boadella, M., Carta, T., Oleaga, A., Pajares, G., Muñoz, M., Gortázar, C. 2010. Serosurvey for selected pathogens in Iberian roe deer. *BMC Veterinary Research*, 16: 51-56.
34. Boadella, M., Gortazar, C. 2011. Effect of haemolysis and repeated freeze-thawing cycles on wild boar serum antibody testing by ELISA. *BMC research notes* 4: 498.
35. BOE, 2010. Orden MARM/3373/2010, de 27 de diciembre de 2010.
36. Bonneau, K.R., De Maula, 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.

37. Bouwknegt, C., van Rijn, P.A., Schipper, J.J., Hölzel, D., Boonstra, J., Nijhof, A.M., van Rooij, E.M., Jongejan, F. 2010. Potential role of ticks as vectors of bluetongue virus. *Experimental and Applied Acarology* 52(2): 183-192.
38. Boza López, J. 2007. Recursos ganaderos de Andalucía, *Anales, Real academia de ciencias veterinarias de Andalucía oriental* 20(1): 217-242.
39. Braza, F. 2003. Gamo. *Dama dama*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Carrascal, L. M., Salvador, A. Ed. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. Web: <http://www.vertebradosibericos.org/>
40. Breard, E., Hamblin, C., Hammoumi, S., Sailleau, C., Dauphin, G., Zientara, S. 2004. The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica. *Veterinary Science* 77: 1-8.
41. Brewer, A.W., MacLachlan, N.J. 1994. The pathogenesis of bluetongue virus infection of bovine blood cells in vitro: ultrastructural characterization. *Archives of Virology* 136: 287-298.
42. Brodie, S.J., Wilson, W.C., O'Hearn, P.M., Muthui, D., Diem, K., Pearson, L.D. 1998. The effects of pharmacological and lentivirus-induced immune suppression on orbivirus pathogenesis: assessment of virus burden in blood monocytes and tissues by reverse transcription-in situ PCR. *Journal of Virology* 72(7): 5599-5609.
43. Buxadé Carbó, C. 2007. Presente y futuro de la ganadería en Andalucía. *Mundo Ganadero* 202: 2-4.
44. Calistri, P., Giovanni, A., Conte, A., Nannini, D., Santucci, U., Patta, C., Rolesu, S., Caporale, V. 2004. Bluetongue in Italy: part I. *Veterinaria Italiana* 40: 243-251.
45. Calistri, P., Giovannini, A., Savini, G., Bonfanti, L., Cordioli, P., Lelli, R., Caporale, V. 2010. Antibody response in cattle vaccinated against bluetongue serotype 8 in Italy. *Transboundary Emerging Diseases* 57: 180-184.
46. Calvete, C., Calvo, J.H., Calavia, R., Miranda, M.A., Borrás, D., Estrada, R., Lucientes, J., Mañuz, B., Romero, L. 2008. Culicoides species and transmission of bluetongue virus in Spain. *The Veterinary Record* 162(8): 255.
47. Capela, R., Sousa, C., Pena, I., Caeiro, V. 1993. Preliminary note on the distribution and ecology of *Culicoides imicola* in Portugal. *Medical and Veterinary Entomology* 7(1): 23-26.
48. Capela, R., Purse, B.V., Pena, I., Wittman, E.J., Margarita, Y., Capela, M., Romão, L., Mellor, P.S., Baylis, M. 2003. Spatial distribution of *Culicoides* species in Portugal in relation to the transmission of African horse sickness and bluetongue viruses. *Medical and Veterinary Entomology* 17(2): 165-177.
49. CAPMA, 2013. Portal andaluz de la caza y la Pesca: Datos y estadísticas: <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/pcp>
50. Caracappa, S., Torina, A., Guercio, A., Vitale, F., Calabro, A., Purpari, G.,

- Ferrantelli, V., Vitale, M., Mellor, P. S. 2003. Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Veterinary Record* 153: 71-74
51. Carbonero, A., Paniagua, J., Torralbo, A., Arenas-Montes, A., Borge, C., García-Bocanegra, I. Prevalence, risk factors and antimicrobial susceptibility on *Campylobacter* infection in game species from Southern Spain. No publicado.
52. 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(1): 73-78.
53. Carranza Almansa, J. 2002. Producción y conservación en la gestión de la caza. *Medio Ambiente, Monográficos*, 41.
54. Caron, A., Miguel, E., Gomo, C., Makaya, P., Pfukenyi, D.M., Foggin, C., Hove, T., de Garine-Wichatitsky, M. 2013. Relationship between burden of infection in ungulate populations and wildlife/livestock interfaces. *Epidemiology and Infection* 26: 1-14.
55. Cêtre-Sossah, C., Madani, H., Sailleau, C., Nomikou, K., Sadaoui, H., Zientara, S., Maan, S., Maan, N., Mertens, P., Albina, E. 2010. Molecular epidemiology of bluetongue virus serotype 1 isolated in 2006 from Algeria. *Research in Veterinary Science* 91(3): 486-497.
56. Chandler, L.J., Ballinger, M.E., Jones, R.H., Beaty, B.J. 1985. The virogenesis of bluetongue virus in *Culicoides variipennis*. *Progress in Clinical and Biological Research* 178: 245-253.
57. Chomel, B.B., Carniciu, M.L., Kasten, R.W., Castelli, P.M., Work, T.M., Jessup, D.A. 1994. Antibody prevalence of eight ruminant infectious diseases in California mule and black-tailed deer (*Odocoileus hemionus*). *Journal of Wildlife Diseases* 30(1): 51-59.
58. Collen, T., Mertens, P.P., Burroughs, J.N., Butcher, R.N., Anderson, J., Windsor, M., Takamatsu, H. 1992. Monoclonal antibodies produced against bluetongue and African horse sickness viruses by in vitro immunization show a bias for structural protein VP7. En: *Bluetongue, African Horse Sickness and related Orbivirus*. Walton T.E., Osburn B.I. Ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA pp. 416-422.
59. Conraths, F.J., Gethmann, J.M., Staubach, C., Mettenleiter, T.C., Beer, M., Hoffmann, B. 2009. Epidemiology of Bluetongue Virus Serotype 8, Germany. *Emerging Infectious Diseases* 15, 433-435.
60. Corbière, F., Nussbaum, S., Alzieu, J.P., Lemaire, M., Meyer, G., Foucras, G., Schelcher, F. 2012. Bluetongue virus serotype 1 in wild ruminants, France, 2008-10. *Journal of Wildlife Diseases* 48(4): 1047-1051.
61. Couvillion, C.E., Jenney, E.W., Pearson, J.E., Coker, M.E. 1980. Survey for antibodies to viruses of bovine virus diarrhea, bluetongue, and epizootic hemorrhagic disease in hunter-killed mule deer in New Mexico. *Journal of*

- American Veterinary Medicine 177(9): 790-791.
62. Dal Pozzo, F., De Clercq, K., Guyot, H., Vandemeulebroucke, E., Sarradin, P., Vandebussche, F., Thiry, E., Saegerman, C. 2009. Experimental reproduction of bluetongue virus serotype 8 clinical disease in calves. 2009. *Veterinary Microbiology* 136(3-4): 352-358.
63. Darpel, K.E., Batten, C.A., Veronesi, E., Williamson, S., Anderson, P., Dennison, M., Clifford, S., Smith, C., Philips, L., Bidewell, C., Bachanek-Bankowska, K., Sanders, A., Bin-Tarif, A., Wilson, A.J., Gubbins, S., Mertens, P.P., Oura, C.A., Mellor, P.S. 2009. Transplacental transmission of bluetongue virus 8 in cattle, UK. *Emerging Infectious Disease* 15(12): 2025-2028.
64. Davies, F.G., Mungai, J.N., Pini, A. 1992. A new bluetongue virus serotype isolated in Kenya. *Veterinary Microbiology* 31(1): 25-32.
65. De Curtis, M., Bartolini, C., Canonico, C., Duranti, A., Leoni, F., Mancini, P., Moscatelli, F., Rocchegiani, E., Gavaudan, S. 2006. Serological monitoring of bluetongue virus in wild ruminants of the Pesaro-Urbino district (Italy). *Sanita Pubblica Veterinaria* 40: 43.
66. De Deken, G., Madder, M., Deblauwe, I., De Clercq, K., Fassotte, C., Losson, B., Haubruge, E., De Deken, R. 2008. Vector monitoring at Belgian outbreak sites during the bluetongue epidemic of 2006. *Preventive Veterinary Medicine* 87(1-2): 64-73.
67. De la Concha-Bermejillo, A., Odeon, A., BonDurant, R.H., Osburn, B. I. 1993. Experimental infection of pregnant cattle with bluetongue virus serotype 11 between postbreeding days 21 and 48. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5: 329-335.
68. Del Rio-López, R., Miranda, M.A., Paredes-Esquivel, C., Lucientes, J., Calvete, C., Estrada, R., Venter, G.J. 2012. Recovery rates of bluetongue virus serotypes 1, 2, 4 and 8 Spanish strains from orally infected *Culicoides imicola* in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology* 26(2): 162-167.
69. DeMaula, C.D., Leutenegger, C.M., Bonneau, K.R., MacLachlan, N.J. 2002. The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of bluetongue. *Virology* 296: 330-337.
70. Dijkstra, E., van der Ven, I.J., Meiswinkel, R., Holzel, D.R., Van Rijn, P.A., Meiswinkel, R. 2008. *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Record* 162: 422.
71. Drew, C.P., Gardner, I.A., Mayo, C.E., Matsuo, E., Roy, P., MacLachlan, N.J. 2010. Bluetongue virus infection alters the impedance of monolayers of bovine endothelial cells as a result of cell death. 2010. *Veterinary Immunology Immunopathology* 136(1-2): 108-115.
72. Du Plessis, D.H. 1992. Serological differentiation of five bluetongue virus serotypes in indirect ELISA. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 59(2): 119-122.

73. Dubay, S.A., Noon, T.H., de Vos, J.C. Jr., Ockenfels, R.A. 2006. Serologic survey for pathogens potentially affecting pronghorn (*Antilocapra americana*) fawn recruitment in Arizona, USA. *Journal of Wildlife Diseases* 42(4): 844-848.
74. Dunbar, M.R., Cunningham, M.W., Roof, J.C. 1998. Seroprevalence of selected disease agents from free-ranging black bears in Florida. *Journal of Wildlife Diseases* 34(3): 612-619.
75. Dunbar, M.R., Velarde, R., Gregg, M.A., Bray, M. 1999. Health evaluation of a pronghorn antelope population in Oregon. *Journal of Wildlife Diseases* 35(3): 496-510.
76. Dungu, B., Gerdes, T., Smit, T. 2004. The use of vaccination in the control of bluetongue in southern Africa. *Veterinaria itaiana* 40 (4): 616-622.
77. EFSA. 2007. Scientific Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on request from the European Commission on Bluetongue vectors and vaccines. *The EFSA Journal* 479: 1-29.
78. EFSA. 2009. Opinion on epizootic hemorrhagic disease. *The EFSA Journal* 1418: 1-67.
79. EFSA. 2012. "Schmallenberg" virus: analysis of the epidemiological data. *The EFSA Journal* 261: 1-30.
80. Elbers, A., Backx, A., van der Spek, A., Ekker, M., Leijts, P., Steijn, K., van Langen, H., van Rijn, P. 2008. Epidemiology of bluetongue virus serotype 8 outbreaks in the Netherlands in 2006. *Tijdschr Diergeneesk* 133(6): 222-229.
81. Erasmus, B.J. 1990. Bluetongue virus. En *Virus Injections of Ruminants*. Dinter, Z., Morein, B. Ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holanda. pp. 227-237.
82. Erasmus, B.J. y Potgieter, A.C. 2009. The history of blueotngue. En: *Bluetongue*. Mellor, P.S., Baylis, M., Mertens, P. Ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holanda. pp. 7-21.
83. Eschbaumer, M., Hoffmann, B., Moss, A., Savini, G., Leone, A., König, P., Zemke, J., Conraths, F., Beer, M. 2010. Emergence of bluetongue virus serotype 6 in Europe, German field data and experimental infection of cattle. *Veterinary Microbiology* 143(2-4): 189-195.
84. Eschbaumer, M., Schulz, C., Wäckerlin, R., Gaulty, M., Beer, M., Hoffmann, B. 2011. Limitations of sandwich ELISAs for bluetongue virus antibody detection. *Veterinary Record* 168(24): 643.
85. Falconi, C., López-Olvera, J.R., Gortázar, C. 2011. BTV infection in wild ruminants, with emphasis on red deer: A review. 2011. *Veterinary Microbiology* 151 (3-4): 209-219.
86. Falconi, C., López-Olvera, J.R., Boadella, M., Camarena, J., Rosell, R., Alcaide, V., Vicente, J., Sánchez-Vizcaíno, J.M., Pujols, J., Gortázar, C. 2012. Evidence

- for BTV-4 circulation in free-ranging red deer (*Cervus elaphus*) in Cabañeros National Park, Spain. *Veterinary Microbiology* 159(1-2): 40-46.
87. Fernández-Pacheco, P., Fernández-Piñero, J., Agüero, M., Jiménez-Clavero, M.A., 2008. Bluetongue virus serotype 1 in wild mouflons in Spain. *Veterinary Record* 162: 659-660.
88. Fischer-Tenhagen, C., Hamblin, C., Quandt, S., Frolich, K. 2000. Serosurvey for selected infectious disease agents in free-ranging black and white rhinoceros in Africa. *Journal of Wildlife Diseases* 36(2): 316-323
89. Flanagan, M., Johnson S.J. 1995. The effects of vaccination of Merino ewes with an attenuated Australian BTV serotype 23 at different stages of gestation. *Australian veterinary Journal* 72: 455-457.
90. Fletch, A.L., Karstad, L.H. 1971. Studies on the pathogenesis of experimental epizootic hemorrhagic disease of white-tailed deer. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 35(3):224-229.
91. Formenty, P., Domenech, J., Lauginie, F., Ouattara, M., Diawara, S., Raath, J.P., Grobler, D., Leforban, Y., Angba, A. 1994. Epidemiologic study of bluetongue in sheep, cattle and different species of wild animals in the Ivory Coast. *Revue scientifique et technique Office international des Epizooties* 13(3): 737-751.
92. Frölich, K., Hamblin, C., Jung, S., Ostrowski, S., Mwanzia, J., Streich, W.J., Anderson, J., Armstrong, R.M., Anajariyah, S. 2005. Serologic surveillance for selected viral agents in captive and free-ranging populations of Arabian oryx (*Oryx leucoryx*) from Saudi Arabia and the United Arab Emirates. *Journal of Wildlife Diseases* 41(1):67-79.
93. Gandhale, P.N., Bhanuprakash, V., Balamurugan, V., Hosamani, M., Venkatesan, G., Singh, R.K. 2010. Detection of bluetongue virus group-specific antigen using monoclonal antibody based sandwich ELISA. *Virologica Sinica* 25(6): 390-400.
94. García Romero, C. y Cordero Morales, R. 2006. Las razas autóctonas en el contexto de la ganadería ecológica. *Revista de Ganadería* 38: 32-39.
95. García, A., Landete-Castillejos, T., Molina, A., Albiñana, B., Fernández, C., Garde, J., Gallego, L. 1999. Lactation curves in captive Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Journal of Animal Science* 77(12): 3150-3155.
96. García, I., Napp, S., Casal, J., Perea, A., Allepuz, A., Alba, A., Carbonero, A., Arenas, A. 2009. Bluetongue epidemiology in wild ruminants from Southern Spain. *European Journal Wildlife of Research* 55: 173-178.
97. García-Bocanegra I, Arenas-Montes A, Lorca-Oró C, Pujols J, González MA, Napp S, Gómez-Guillamón F, Zorrilla I, Miguel ES, Arenas A. 2011a. Role of wild ruminants in the epidemiology of bluetongue virus serotypes 1, 4 and 8 in Spain. *Veterinary Research* 42(1): 88.
98. García-Bocanegra, I., Jaén-Téllez, J.A., Napp, S., Arenas-Montes, A., Fernández-

- Morente, M., Fernández-Molera, V., Arenas, A. 2011b. West Nile fever outbreak in horses and humans, Spain, 2010. *Emerging Infectious Diseases* 17: 2397-2399.
99. García-Bocanegra, I., Pérez de Val, B., Arenas-Montes, A., Paniagua, J., Boadella, M., Gortázar, C., Arenas A. 2012. Seroprevalence and risk factors associated to *Mycobacterium bovis* in wild artiodactyl species from southern Spain, 2006-2010. *PLoS One* 7(4):doi: 10.1371/journal.pone.0034908.
100. García-Bocanegra, I., Zorrilla, I., Rodríguez, E., Rayas, E., Camacho, L., Redondo, I., Gómez-Guillamón, F. 2013. Monitoring of the Bagaza Virus Epidemic in Wild Bird Species in Spain, 2010. *Transboundary and Emerging Diseases* 60(2): 120-126.
101. Gaydos, J.K., Davidson, W.R., Elvinger, F., Howerth, E.W., Murphy, M., Stallknecht, D.E. 2002. Cross-protection between epizootic hemorrhagic disease virus serotypes 1 and 2 in white-tailed deer. *Journal of Wildlife Diseases* 38(4): 720-728.
102. Gaydos, J.K., Crum, J.M., Davidson, W.R., Cross, S.S., Owen, S.F., Stallknecht, D.E. 2004. Epizootiology of an epizootic hemorrhagic disease outbreak in West Virginia. *Journal of Wildlife Diseases* 40(3): 383-393
103. Gerdes, G.H. 2004. A South African overview of the virus, vectors, surveillance and unique features of bluetongue. *Veterinaria Italiana* 40 (3): 39-42.
104. Gibbs, E.P., Lawman, M.J. 1977. Infection of British deer and farm animals with epizootic haemorrhagic disease of deer virus. *Journal of Comparative Pathology* 87(3): 335-343.
105. Gibbs, E.P., Lawman, M.J., Herniman, K.A. 1979. Preliminary observations on transplacental infection of bluetongue virus in sheep—a possible overwintering mechanism. *Research in Veterinary Science* 27(1): 118-120.
106. Goffredo, M., Conte, A., Meiswinkel, R. 2004. Distribution and abundance of *Culicoides imicola*, *Obsoletus* Complex and *Pulicaris* Complex (Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Veterinaria Italiana* 40(3): 270-273.
107. Gómez-Tejedor C. 2004. Brief overview of the bluetongue situation in Mediterranean Europe, 1998-2004. *Veterinaria Italiana* 40(3): 57-60.
108. Gomez-Villamandos, J.C., Sanchez, C., Carrasco, L., Laviada, M.M., Bautista, M.J., Martinez-Torrecuadrada, J., Sanchez-Vizcaino, J.M., Sierra, M.A. 1999. Pathogenesis of African horse sickness: ultrastructural study of the capillaries in experimental infection. *Journal of Comparative Pathology* 121: 101-116
109. González, M., López, S., Mullens, B.A., Baldet, T., Goldarazena A. 2013. A survey of *Culicoides* developmental sites on a farm in northern Spain, with a brief review of immature habitats of European species. *Veterinary Parasitology* 191: 81-93.
110. Gorman, B.M. 1992. An overview of the orbiviruses. In: Walton, T.E., Osburn,

- B.I. Bluetongue, African horse sickness and related orbiviruses. 2nd International Symposium, CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Proceedings pp. 335–347.
111. Gortázar, C., Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., Vicente, J. 2006. Disease risks and overabundance of game species. *European Journal of Wildlife Research* 52: 81–87.
112. Gortázar, C., Torres, M.J., Vicente, J., Acevedo, P., Reglero, M., de la Fuente, J., Negro, J.J., Aznar-Martín, J. 2008. Bovine tuberculosis in Doñana Biosphere Reserve: the role of wild ungulates as disease reservoirs in the last Iberian lynx strongholds. *PLoS One* 3(7).
113. Gortázar, C., Vicente, J., Boadella, M., Ballesteros, C., Galindo, R.C., Garrido, J., Aranaz, A., de la Fuente, J. 2011. Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife. *Veterinary Microbiology* 151(1-2): 170-178.
114. Gowen, B.B. y Holbrook, M.R. 2008. Animal models of highly pathogenic RNA viral infections: hemorrhagic fever viruses. *Antiviral Research* 78: 79–90
115. Granados, J. E., Pérez, J. M., Márquez, F. J., Serrano, E., Soriguer, R. C., Fandos, P. 2001. La Cabra montés (*Capra pyrenaica*, Schinz 1838). *Galemys* 13(1): 3-37.
116. Gür, S. 2008. A serologic investigation of blue tongue virus (BTV) in cattle, sheep and gazella subgutturosa subgutturosa. *Tropical Animal Health and Production* 40: 217–221.
117. Hamblin, C., Anderson, E.C., Jago, M., Mlengeya, T., Hipji, K. 1990. Antibodies to some pathogenic agents in free-living wild species in Tanzania. *Epidemiology and Infection* 105(3): 585-594.
118. Hamblin, C., Salt, J.S., Graham, S.D., Hopwood, K., Wade-Evans, A.M. 1998. Bluetongue virus serotypes 1 and 3 infection in Poll Dorset sheep. *Australian Veterinary Journal* 76(9): 622-629.
119. Hamers, C., Galleau, S., Chery, R., Blanchet, M., Besancon, L., Cariou, C., Werle-Lapostolle, B., Hudelet, P., Goutebroze, S. 2009. Use of inactivated bluetongue virus serotype 8 vaccine against virulent challenge in sheep and cattle. *Veterinary Record* 165: 369-373.
120. Hardy, W.T., Price, D.A. 1954. Isolation of the bluetongue virus from Texas sheep-Culicoides shown to be a vector. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 124(925): 255-258.
121. Hemati, B., Contreras, V., Urien, C., Bonneau, M., Takamatsu, H.H., Mertens, P. P., Breard, E., Sailleau, C., Zientara, S., Schwartz-Cornil, I. 2009. Bluetongue virus targets conventional dendritic cells in skin lymph. *Journal of Virology* 83: 8789–8799.
122. Hermoso, M. 2005. Lengua azul: revisión y actualización. *Información Veterinaria*, Marzo 2005: 50-53.
123. Hoff, G.L., Trainer, D.O. 1974. Observations on bluetongue and epizootic

- hemorrhagic disease viruses in white-tailed deer: (1) distribution of virus in the blood (2) cross-challenge. *Journal of Wildlife Diseases* 10(1): 25-31.
124. Hoff GL, Trainer DO, Jochim MM. 1974. Bluetongue virus and white-tailed deer in an enzootic area of Texas. *Journal of Wildlife Diseases* 10(2): 158-163.
125. Hoff, G.L., Trainer, D.O. 1974. Observations on bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses in white-tailed deer: (1) distribution of virus in the blood, (2) cross challenge. *Journal of Wildlife Diseases* 10: 25-31.
126. Hoffmann, B., Sasserath, M., Thalheim, S., Bunzenthal, C., Strebelow, G., Beer, M. 2008a. Bluetongue virus serotype 8 reemergence in Germany, 2007 and 2008. *Emerging Infectious Diseases* 14(9): 1421-1423.
127. Hoffmann, M.A., Renzullo, S., Mader, M., Chaignat, V., Worwa, G., Thuer, B. 2008b. Genetic characterization of Toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerging Infectious Diseases* 14(12): 1855-1861.
128. Hoffmann, B., Eschbaumer, M., Beer, M. 2009. Real-time 350 quantitative reverse transcription-PCR assays specifically detecting bluetongue virus serotypes 1, 6, and 8. *Journal of Clinical Microbiology* 47: 2992-2994.
129. Howerth, E.W., Stalknecht, D.E., Kirkland, P.D. 2001. Bluetongue, epizootic haemorrhagic disease, and other orbivirus-related diseases. En Williams, E.S., I.K., Barker. *Infectious diseases of wild mammals*. ED. Iowa State University, Iowa, pp. 77-97.
130. Howerth, E.W., Tyler, D.E. 1988. Experimentally induced bluetongue virus infection in white-tailed deer: ultrastructural findings. *American Journal of Veterinary Research* 49 (11): 1914-1922.
131. Hübschle, O.J., Lorenz, R.J., Matheka, H.D. 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bluetongue virus antibodies. *American Journal of Veterinary Research* 42(1): 61-65.
132. Huismans, H., Cloete, M. 1987. A comparison of different cloned bluetongue virus genome segments as probes for the detection of virus-specified RNA. *Virology* 158(2): 373-380.
133. Inaba, U. 1975. Ibaraki disease and its relationship to bluetongue. *Australian Veterinary Journal* 51: 178-185.
134. Janardhana, V., Andrew, M.E., Lobato, Z.I., Coupar, B.E. 1999. The ovine cytotoxic T lymphocyte responses to bluetongue virus. *Research in Veterinary Science* 67: 213-221.
135. 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., Coignoul, F.L. 2008. Bluetongue in Eurasian lynx. *Emerging Infectious Diseases* 14(9): 1496-1498.
136. Jeggo, M.H., Gumm, I.D., Taylor, W.P. 1983. Clinical and serological response of sheep to serial challenge with different bluetongue virus types. *Research in*

- Veterinary Science 34: 205–211.
137. Jiménez-Clavero, M.Á. 2012. Animal viral diseases and global change: bluetongue and West Nile fever as paradigms. *Frontiers in Genetics* 3: 105.
138. Johnson, J.L., Barber, T.L., Frey, M.L., Nason, G. 1986. Serologic survey of selected 1986 pathogens in white-tailed and mule deer in western Nebraska. *Journal of Wildlife Diseases* 22(4): 515-519.
139. Jones, R.H., Schmidtman, E.T., Foster, N.M. 1983. Vector-competence studies for bluetongue and epizootic hemorrhagic-disease viruses with *Culicoides venustus* (ceratopogonidae). *Mosquito News* 43: 184–186.
140. Jones, L.D., Chuma, T., Hails, R., Williams, T., Roy, P. 1996. The non-structural proteins of bluetongue virus are a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants. *Journal of General Virology* 77: 997–1003.
141. Katz, J., Alstad, D., Gustafson, G., Evermann, J. 1994. Diagnostic analysis of the prolonged bluetongue virus RNA presence found in the blood of naturally infected cattle and experimentally infected sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation* 6: 139–142.
142. Kaufmann, C., Schaffner, F., Mathis, A. 2009. Monitoring of biting midges (*Culicoides* spp.), the potential vectors of the bluetongue virus, in the 12 climatic regions of Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 151(5): 205-213.
143. Kedmi, M., Van Straten, M., Ezra, E., Galon, N., Klement, E. 2010. Assessment of the productivity effects associated with epizootic hemorrhagic disease in dairy herds. *Journal of Dairy Science* 93: 2486–2495.
144. Kedmi, M., Levi, S., Galon, N., Bomborov, V., Yadin, H., Batten, C., Klement, E. 2011. No evidence for involvement of sheep in the epidemiology of cattle virulent epizootic hemorrhagic disease virus. *Veterinary Microbiology* 148: 408–412.
145. Kocan, A.A., Castro, A.E., Shaw, M.G., Rogers, S.J. 1987. Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in white-tailed deer from Oklahoma: serologic evaluation and virus isolation. *American Journal of Veterinary Research* 48(7): 1048-1049.
146. Koumbati, M., Mangana, O., Nomikou, K., Mellor, P.S., Papadopoulos, O. 1999. Duration of bluetongue viraemia and serological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats. *Veterinary Microbiology* 64(4): 277-285.
147. Lehmann, K., Werner, D., Hoffmann, B., Kampen, H. 2012. PCR identification of culicoid biting midges (Diptera, Ceratopogonidae) of the *Obsoletus* complex including putative vectors of bluetongue and Schmallenberg viruses. *Parasites and Vectors* 5: 213.
148. Linden, A., Mousset, B., Grégoire, F., Hanrez, D., Vandebussche, F., Vandemeulebroucke, E., Vanbinst, T., Verheyden, B., de Clerck, K. 2008.

- Bluetongue virus antibodies in wild red deer in southern Belgium. The Veterinary Record 162: 459.
149. Linden, A., Gregoire, F., Nahayo, A., Hanrez, D., Mousset, B., Massart, A.L., De Leeuw, I., Vandemeulebroucke, E., Vandenbussche, F., De Clercq, K. 2010. Bluetongue virus in wild deer, Belgium, 2005-2008. Emerging Infectious Diseases 16(5): 833-836.
150. Lobato, Z.I., Coupar, B.E., Gray, C.P., Lunt, R., Andrew, M.E. 1997. Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus expressed bluetongue virus antigens. Veterinary Immunology and Immunopathology 59: 293-309.
151. Loeffler, F. y Frosch, P. 1897. Summarischer Bericht ueber die Ergebnisse der Untersuchungen der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bei dem Institut fuer infektiionskrankheiten in Berlin. Zent Bakt Parasikde 22: 257-259.
152. López, A.C., Sánchez-Botija, C. 1958. Epizootie de fièvre catarrhale ovine en Espagne (Bluetongue). Bulletin OIE 50: 65-93.
153. López-Olvera, J.R., Falconi, C., Fernández-Pacheco, P., Fernández-Pinero, J., Sánchez, M.A., Palma, A., Herruzo, I., Vicente, J., Jiménez-Clavero, M.A., Arias, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M., Gortázar, C. 2010. Experimental infection of European red deer (*Cervus elaphus*) with bluetongue virus serotypes 1 and 8. Veterinary Microbiology 145(1-2): 148-152.
154. Lorca-Oró, C., Pujols, J., Arenas, A., Gómez-Guillamón, F., Zorrilla, I., Domingo, M., Arenas-Montes, A., Ruano, M.J., 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(1-2): 230-235.
155. Lorca-Oró, C., López-Olvera, J.R., Fernández-Sirera, L., Solanes, D., Navarro, N., García-Bocanegra, I., Lavín, S., Domingo, M., Pujols, J. 2012a. Evaluation of the efficacy of commercial vaccines against bluetongue virus serotypes 1 and 8 in experimentally infected red deer (*Cervus elaphus*). Veterinary Microbiology 154(3-4): 240-246.
156. Lorca-Oró, C., Pujols, J., García-Bocanegra, I., Mentaberre, G., Granados, J.E., Solanes, D., Fandos, P., Galindo, I., Domingo, M., Lavín, S., López-Olvera, J.R. 2012b. Protection of Spanish Ibex (*Capra pyrenaica*) against Bluetongue virus serotypes 1 and 8 in a subclinical experimental infection. Plos One 7(5): e36380. doi:10.1371/journal.pone.0036380.
157. Lucientes, J., Estrada, R., Calvete, C., Miranda, M.A., Borràs, D., García de Francisco, J.M., Moreno, N. 2005. Información veterinaria, Marzo, 2005: 38-41.
158. Luedke, A.J., Jochim, M.M., Bowne, J.G. 1965. Preliminary bluetongue Transmission with the sheep ked *Melophagus ovinus*. Canadian Journal Comparitive Medicine Veterinary Science 29(9): 229-231.
159. Luedke, A.J., Jones, R.H., Walton, T.E. 1977. Overwintering mechanism for

- bluetongue virus: biological recovery of latent virus from a bovine by bites of *Culicoides variipennis*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 26: 313-325.
160. Maan, S., Maan, N.S., Samuel, A.R., Rao, S., Attoui, H., Mertens, P.P. 2007. Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. Journal of General Virology 88(2): 621-630.
161. Maan, S., Maan, N.S., Ross-smith, N., Batten, C.A., Shaw, A.E., Anthony, S.J., Samuel, A.R., Darpel, K.E., Veronesi, E., Oura, C.A., Singh, K.P., Nomikou, K., Potgieter, A.C., Attoui, H., van Rooij, E., van Rijn, P., De Clercq, K., Vandebussche, F., Zientara, S., Bréard, E., Sailleau, C., Beer, M., Hoffman, B., Mellor, P.S., Mertens, P.P. 2008. Sequence analysis of bluetongue virus serotype 8 from the Netherlands 2006 and comparison to other European strains. Virology 377(2): 308-318.
162. Maan, S., Maan, N.S., Nomikou, K., Batten, C., Antony, F., Belaganahalli, M.N., Samy, A.M., Reda, A.A., Al-Rashid, S.A., El Batel, M., Oura, C.A., Mertens, P.P. 2011. Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. Emerging Infectious Diseases 17(5): 886-889.
163. Madani, H., Casal, J., Alba, A., Allepuz, A., Cêtre-Sossah, C., Hafsi, L., Kount-Chareb, H., Bouayed-Chaouach, N., Saadaoui, H., Napp, S., 2011. Animal Diseases Caused by Orbiviruses, Algeria. Emerging Infectious Diseases 17: 2325-2327.
164. MAGRAMA, 2013a. España alcanza el estatus "libre del serotipo 8" del virus de la lengua azul. <http://www.magrama.gob.es/es/prensa/ultimas-noticias/notas-de-prensa-din.aspx?tm=tm:7-248040-16>
165. MAGRAMA, 2013b. Manual práctico de operaciones en la lucha contra la Lengua azul (LA), Revisión de Enero de 2013: 1-84.
166. MAGRAMA, 2009. Anuarios Estadística. <http://www.mames.es/estadistica/temas/anuario-de-estadistica/2009/default.aspx?parte=3&capitulo=14&grupo=1>
167. Martín Bellido, M., Escibano Sánchez, M., Mesías Díaz, F.J., Rodríguez de Ledesma Vega, A., Pulido García, F. 2001. Sistemas extensivos de producción animal. Archivos de Zootecnia 50: 465-489.
168. Martínez, A., Salinas, A., Martínez, F., Cantu, A., Miller, D.K. 1999. Serosurvey for selected disease agents in white-tailed deer from Mexico. Journal of Wildlife Diseases 35(4): 799-803.
169. Mateos-Quesada, P. (2005). Corzo - *Capreolus capreolus*. En: Carrascal, L. M., Salvador, A. Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Ed. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. Web: <http://www.vertebradosibericos.org/>
170. Mauroy, A., Guyot, H., De Clercq, K., Cassart, D., Thiry, E., Saegerman, C. 2008. Bluetongue in captive yaks. Emerging Infectious Diseases 14: 675-676.
171. Mc Kercher, D.G., McGowan, B., Howarth, J.A., Saito, J.K. 1953. A preliminary

- report on the isolation and identification of the bluetongue virus from sheep in California. Journal of the American Veterinary Medicine Association 122 (913): 300-301.
172. McLachlan, N.J. 1994. The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 17(3-4): 197-206
173. McLachlan, N.J., Crafford, J.E., Vernau, W., Gardner, I.A., Goddard, A., Guthrie, A.J., Venter, E.H. 2008. Experimental reproduction of severe bluetongue in sheep. Veterinary Pathology 45(3): 310-315
174. McLachlan, N.J. 2011. Bluetongue: History, global epidemiology, and pathogenesis. Preventive Veterinary Medicine 102 (2): 107-111.
175. McLaughlin, B.E., De Maula, C.D., Wilson, W.C., Boyce, W.M., MacLachlan, N.J. 2003. Replication of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus in pulmonary artery endothelial cells obtained from cattle, sheep, and deer. American Journal of Veterinary Research 64(7): 860-865.
176. Mecham, J.O., Nunamaker, R.A. 1994. Complex interactions between vectors and pathogens: *Culicoides variipennis sonorensis* (Diptera; Ceratopogonidae) infection rates with bluetongue viruses. Journal of Medical Entomology 31: 903-907.
177. Mehlhorn, H., Walldorf, V., Klimpel, S., Hahn, B., Jaeger, F., Eschweiler, J. 2007. First occurrence of *Culicoides obsoletus*-transmitted bluetongue virus epidemic in Central Europe. Parasitology Research 101: 219-228.
178. Meiswinkel, R. 1998. The 1996 outbreak of African horse sickness in South Africa--the entomological perspective. Archives of Virology 14: 69-83.
179. Meiswinkel, R., van Rijn, P., Leijts, P. and Goffredo, M. 2007. Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. Veterinary Record 161: 564-565.
180. Mellor, P.S., Jennings, D.M., Wilkinson, P.J., Boorman, J.P. 1985. *Culicoides imicola*: a bluetongue virus vector in Spain and Portugal. Veterinary Record 116(22): 589-590.
181. Mellor, P.S., Boned, J., Hamblin, C., Graham S. 1990. Isolations of African horse sickness virus from vector insects made during the 1988 epizootic in Spain. Epidemiology and Infection 105: 447-454.
182. Mellor, P. S. (1994). Epizootiology and vectors of African horse sickness virus. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases 17: 287-296.
183. Mellor, P.S. 2000. Replication of Arboviruses in Insect Vectors. Comparative Pathology 123: 231-247.
184. Mellor, P. S, Wittmann, E.J. 2002. Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998-2001. The Veterinary Journal 164: 20-37.
185. Mellor, P.S. 2004. Infection of the vectors and bluetongue epidemiology in

- Europe. *Veterinaria Italiana* 40(3): 167-174.
186. 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(1-2): 4-20.
187. Mertens, P.P., Brown, F., Sangar, D.V. 1984. Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins which they encode. *Virology* 135(1): 207-217.
188. Mertens, P.P., Burroughs, J.N., Anderson, J. 1987. Purification and properties of virus particles, infectious subviral particles, and cores of bluetongue virus serotypes 1 and 4. *Virology* 157(2): 375-386.
189. Mertens, P.P., Pedley, S., Cowley, J., Burroughs, J.N., Corteyn, A.H., Jeggo, M.H., Jennings, D.M., Gorman, B.M. 1989. Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype. *Virology* 70(2): 561-565.
190. Mertens, P.P.C., Burroughs, J.N., Walton, A., Wellby, M.P., Fu, H., O'Hara, R.S., Brookes, S.M., Mellor, P.S. 1996. Enhanced infectivity of modified bluetongue virus particles for two insect cell lines and for two *Culicoides* vector species. *Virology* 217: 582-593.
191. Mertens, P.P.C., Maan, S., Samuel, A., Attoui, H. 2005. Orbivirus Reoviridae. En: *Virus Taxonomy*. Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. Ed. Elsevier/Academic Press, London, pp. 466-483.
192. Mertens, P.P., Maan, N.S., Prasad, G., Samuel, A.R., Shaw, A.E., Potgieter, A.C. 2007. Design of primers and use of RT-PCR assays for typing European bluetongue virus isolates: differentiation of field and vaccine strains. *Journal of General Virology* 88: 2811-2823.
193. Meyrick, B., Christman, B., Jesmok, G. 1991. Effects of recombinant tumor necrosis factor-alpha on cultured pulmonary artery and lung microvascular endothelial monolayers. *American Journal of Pathology* 138: 93-101.
194. Miranda, M.A., Rincón, C., Borrás, D. 2004 Seasonal abundance of *Culicoides imicola* and *C. obsoletus* in the Balearic Islands. *Veterinaria Italiana* 40: 292-295.
195. Mortola, E., Noad, R., Roy, P. 2004. Bluetongue virus outer capsid proteins are sufficient to trigger apoptosis in mammalian cells. *Journal of Virology* 78: 2875-2883.
196. Mullens, F.A. y Hoolbrook, F.R. 1991. Temperature effects on the gonotrophic cycle of the *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of American Mosquito Control Association* 7: 588-591.
197. Muñoz, P.M., Boadella, M., Arnal, M., de Miguel, M.J., Revilla, M., Martínez, D., Vicente, J., Acevedo, P., Oleaga, A., Ruiz-Fons, F., Marín, C.M., Prieto, J.M., de la Fuente, J., Barral, M., Barberán, M., de Luco, D.F., Blasco, J.M., Gortázar, C. 2010. Spatial distribution and risk factors of Brucellosis in

- Iberian wild ungulates. BMC Infectious Diseases 10: 46.
198. Murray, J.O., Trainer, D.O. 1970. Bluetongue Virus in North American Elk. Journal of Wildlife Diseases 6: 144-148.
199. Napp, S., Gubbins, S., Calistri, P., Allepuz, A., Alba, A., García-Bocanegra, I., Giovannini, A., Casal, J. 2011. Quantitative assessment of the probability of bluetongue virus overwintering by horizontal transmission: application to Germany. Veterinary Research 42: 42-44.
200. Napp, S., García-Bocanegra, I., Pagés, A., Allepuz, A., Alba, A., Casal, J. 2013. Assessment of the risk of a bluetongue outbreak in Europe caused by *Culicoides* midges introduced through intracontinental transport and trade networks. Medical and Veterinary Entomology 27: 19-28.
201. Niedbalski, W. 2010. Monitoring studies of bluetongue disease in ruminants imported to Poland from EU. Polish Journal of Veterinary Science 13(2): 333-336
202. Nol, P., Kato, C., Reeves, W. K., Rhyan, J., Spraker, T., Gidlewski, T., Vercauteren, K., Salman, M. 2010. Epizootic hemorrhagic disease outbreak in a captive facility housing white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), bison (*Bison bison*), elk (*Cervus elaphus*), cattle (*Bos taurus*), and goats (*Capra hircus*) in Colorado, USA. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 41: 510-515.
203. Noon, T.H., Wesche, S.L., Cagle, D., Mead, D.G., Bicknell, E.J., Bradley, G.A., Riplog-Peterson, S., Edsall, D., Reggiardo, C. 2002a. Hemorrhagic disease in bighorn sheep in Arizona. Journal of Wildlife Diseases 38: 172-176.
204. Noon, T.H., Wesche, S.L., Heffelfinger, J., Fuller, A., Bradley, G.A., Reggiardo, C. 2002b. Hemorrhagic disease in deer in Arizona. Journal of Wildlife Diseases 38: 177-181.
205. Nunamaker, R.A., Sieburth, P.J., Dean, V.C., Wigington, J.G., Nunamaker, C.E., Mecham, J.O. 1990. Absence of transovarial transmission of bluetongue virus in *Culicoides variipennis*: immunogold labelling of bluetongue virus antigen in developing oocytes from *Culicoides variipennis* (Coquillett). Comparative Biochemical Physiology, Comparative Physiology 96: 19-31.
206. Nusinovici, S., Seegers, H., Joly, A., Beaudeau, F., Fourichon, C. 2012. Increase in the occurrence of abortions associated with exposure to the Bluetongue virus serotype 8 in naïve dairy herds. Theriogenology 8(5): 1140-1151.
207. Odiawa, G., Blue, J.L., Tyler, D.E., Shotts, E.B. 1985. Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in ruminants in Georgia: survey by serotest and virologic isolation. American Journal of Veterinary Research 46(10): 2193-2196.
208. Ohashi, S., Yoshida, K., Watanabe, Y., Tsuda, T. 1999. Identification and PCR restriction fragment length polymorphism analysis of a variant of the Ibaraki virus from naturally infected cattle and aborted fetuses in Japan. Journal of Clinical Microbiology 37: 3800-3803.

209. Ohashi, S., Yoshida, K., Yanase, T., Tsuda, T. 2002. Analysis of intratypic variation evident in an Ibaraki virus strain and its epizootic hemorrhagic disease virus serogroup. *Journal of Clinical Microbiology* 40(10): 3684-3688.
210. OIE. 2009^a. Anexo XXXVIII: Comercio internacional: derechos y obligaciones de los miembros de la OIE, 2009. Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Terrestres, marzo de 2009.
211. OIE. 2009^b. OIE terrestrial manual, 2009. Chapter 2.1.3: Bluetongue and Epizootic hemorrhagic disease, pp. 1-18.
212. OIE. 2012. Fauna salvaje. *Boletín OIE* (2012) 3: 1-49
213. OIE. 2013a. Función y objetivos generales: <http://www.oie.int/es/quienes-somos/>
214. OIE. 2013b. Notas de prensa: Una sola salud: <http://www.oie.int/es/para-los-periodistas/onehealth-es/>
215. OIE. 2013c. Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2013: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2013/>
216. Otori, T., Inaba, Y., Morimoto, T., Tanaka, Y., Ishitani, R. 1969. Ibaraki virus, an agent of epizootic disease of cattle resembling bluetongue. I. Epidemiologic, clinical and pathologic observations and experimental transmission to calves. *Japan Journal of Microbiology* 13(2): 139-157.
217. 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 Supplement* 14: 85-91.
218. Ortega, M.D., Holbrook, F.R., Lloyd, J.E. 1999. Seasonal distribution and relationship to temperature and precipitation of the most abundant species of *Culicoides* in five provinces of Andalusia, Spain. *Journal of the American Mosquito Control Association* 15(3): 391-399.
219. Ortega, J., Crossley, B., Dechant, J.E., Drew, C.P., Maclachlan, N.J. 2010. Fatal bluetongue virus infection in an alpaca (*Vicugna pacos*) in California. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* 22(1): 134-136.
220. Parsonson, I.M., Snowdon, W.A. 1985. Bluetongue, epizootic haemorrhagic disease of deer and related viruses: current situation in Australia. *Progress in Clinical and Biological Research* 178: 27-35.
221. Patakakis, M.J., Papazahariadou, M., Wilson, A., Mellor, P.S., Frydas, S., Papadopoulos, O. 2009. Distribution of *Culicoides* in Greece. *Journal of Vector Ecology* 34(2): 243-251.
222. Patton, J.F., Work, T.M., Jessup, D.A., Hietala, S.K., Oliver, M.N., Maclachlan, N.J. 1994. Serologic detection of bluetongue virus infection of black-tailed deer: comparison of serum neutralization, agar gel immunodiffusion, and competitive ELISA assays. *Journal of Wildlife Diseases* 30(1): 99-102.

223. Paweska, J.T., Venter, G.J., Hamblin, C. 2005. A comparison of the susceptibility of *Culicoides imicola* and *C. bolitinos* to oral infection with eight serotypes of epizootic haemorrhagic disease virus. *Medicine Veterinary Entomology* 19(2): 200-207.
224. Pelosse, P., Kribs-Zaleta, C.M. 2012. The role of the ratio of vector and host densities in the evolution of transmission modes in vector-borne diseases. The example of sylvatic *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Theoretical Biology* 312: 133-142.
225. Pérez, J.M., García-Ballester, J.A., López-Olvera, J.R., Serrano, E. 2012. Monitoring bluetongue virus vectors in Andalusia (SW Europe): *Culicoides* species composition and factors affecting capture rates of the biting midge *Culicoides imicola*. *Parasitology Research* 111(3): 1267-1275.
226. Pini, A. 1976. Study on the pathogenesis of bluetongue: replication of the virus in the organs of infected sheep. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 43(4): 159-164.
227. Prestwood, A.K., Kistner, T.P., Forest, L., Kellogg, E., Hayes, F.A. 1974. The 1971 outbreak of hemorrhagic disease among white-tailed deer of the southeastern United States. *Journal of Wildlife Diseases* 10: 217-224.
228. Price, D.A., Hardy, W.T. 1954. Isolation of the Bluetongue virus from Texas sheep-*Culicoides* shown to be a vector. *Journal of American Veterinary Medicine* 124: 255-258.
229. Purse, B.V., Tatem, A.J., Caracappa, S., Rogers, D.J., Mellor, P.S., Baylis, M., Torina, A. 2004. Modelling the distribution of *Culicoides* bluetongue virus vectors in Sicily in relation to satellite-derived climate variables. *Medical and Veterinary Entomology* 18: 90-101.
230. Purse, B.V., Mellor, P.S., Rogers, D.J., Samuel, A.R., Mertens, P.P., Baylis, M. 2005. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature Reviews Microbiology* 3: 171-181.
231. Quist, C.F., Howerth, E.W., Stallknecht, D.E., Brown, J., Pisell, T., Nettles, V.F. 1997. Host defense responses associated with experimental hemorrhagic disease in white-tailed deer. *Journal of Wildlife Diseases* 33(3): 584-599.
232. Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C., Hinchcliff K.W. 2002. Lengua azul. En: *Medicina Veterinaria: Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*, Vol. 2, IX Edición. Ed. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U., Madrid, pp. 1-2216.
233. Rasmussen, L.D., Rasmussen, T.B., Belsham, G.J., Strandbygaard, B., Bøtner, A. 2010. Bluetongue in Denmark during 2008. *Veterinary Record* 166(23): 714-718.
234. RASVE. 2013. Página web del MAGRAMA, Red de Alerta Sanitaria Veterinaria (RASVE), consulta de focos: http://rasve.magrama.es/RASVE_2008/Publica/Focos/Consulta.aspx

- 235.Ratinier, M., Caporale, M., Golder, M., Franzoni, G., Allan, K., Nunes, S.F., Armezzani, A., Bayoumy, A., Rixon, F., Shaw, A., Palmarini, M. 2011. Identification and characterization of a novel non-structural protein of bluetongue virus. *PLoS Pathogens* 7(12): 1-14.
- 236.Rawlings, P., Pro, M.J., Pena, I., Ortega, M.D., Capela, R. 1997. Spatial and seasonal distribution of *Culicoides imicola* in Iberia in relation to the transmission of African horse sickness virus. *Medical Veterinary Entomology* 11(1): 49-57.
- 237.Reeves, W.C. 1974. Overwintering of arboviruses. *Program Medicine Virology* 17: 193-220.
- 238.Richards, R.G., MacLachlan, N.J., Heidner, H.W., Fuller, F.J. 1988. Comparison of virologic and serologic responses of lambs and calves infected with bluetongue virus serotype 10. *Veterinary Microbiology* 18(3-4): 233-242.
- 239.Rivera, H., Madewell, B. R., Ameghino, E. 1987. Serologic survey of viral antibodies in the Peruvian alpaca (*Lama pacos*). *American Journal of Veterinary Research* 48: 189-191.
- 240.Robinson, R.M., Hailey, T.L., Livingston, C.W. Thomas, J.W. 1967. Bluetongue in the desert bighorn sheep. *Journal of Wildlife Management* 33: 165-168
- 241.Rodríguez-Sánchez, B., Gortázar, C., Ruiz-Fons, J.F., Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2010. Bluetongue virus serotypes 1 & 4 in red deer, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 16(3): 518-520.
- 242.Rodríguez-Sánchez, B., Sánchez-Cordón, P.J., Molina, V., Risalde, M.A., Pérez de Diego, A.C., Gómez-Villamandos, J.C., Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2010. Detection of bluetongue serotype 4 in mouflons (*Ovis aries musimon*) from Spain. *Veterinary Microbiology* 141(1-2): 164-167.
- 243.Romero, J.R., Villamil, L.C., Pinto, J.A. 1999. Impacto económico de enfermedades animales en sistemas productivos en Sudamérica: estudios de caso. *Revue scientifique et technique Office international des Epizooties* 18(2): 499 -511.
- 244.Romón, P., Higuera, M., Delécolle, J.C., Baldet, T., Aduriz, G., Goldarazena, A. 2012. Phenology and attraction of potential *Culicoides* vectors of bluetongue virus in Basque Country (northern Spain). *Veterinary Parasitology* 186(3-4): 415-424.
- 245.Rossi, S., Gibert, P., Hars, J., Mastain, O., Couteux, P., Barbier, S., Zenoni, V., Novella, C., Gueneau, E., Gauthier, D., Game, Y., Chenouf, N., Keck, N., Breard, E., Zientara, S., Moinet, M., Ballenghien, T., Delecolle, J.C., Mathieu, B., Mathevet, P., Bost, F. 2009. Circulation et impact du virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) chez les ruminants sauvages. *GEEFSM*, Col du Marchairuz, Suiza, Junio de 2009.
- 246.Rossi, S., Pioz, M., Beard, E., Durand, B., Gibert, P., Gauthier, D., Klein, F., Maillard, D., Saint-Andrieux, C., Saubusse, T., Hars, J. 2013. Bluetongue

- Dynamics in French Wildlife: Exploring the Driving Forces. *Transboundary and Emerging Diseases* doi: 10.1111/tbed.12061.
247. Roug, A., Swift, P., Torres, S., Jones, K., Johnson, C.K. 2012. Serosurveillance for livestock pathogens in free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*). *PLoS One* 7(11):e50600. doi: 10.1371/journal.pone.0050600.
248. Roy, P. 1992. Bluetongue virus proteins. *Journal of General Virology* 73(12): 3051-3064.
249. Roy, P., Urakawa, T., Van Dijk, A.A., Erasmus, B.J. 1990. Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep. *Journal of Virology* 64: 1998–2003
250. Ruder, M.G., Allison, A.B., Stallknecht, D.E., Mead, D.G., McGraw, S.M., Carter, D.L., Kubiski, S.V., Batten, C.A., Klement, E., Howerth, E.W. 2012. Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to experimental infection with epizootic hemorrhagic disease virus serotype 7. *Journal of Wildlife Diseases* 48(3): 676-685.
251. Ruiz-Fons, F., Reyes-García, A.R., Alcaide, V., Gortázar, C. 2008. Spatial and temporal evolution of bluetongue virus in wild ruminants, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 14(6): 951-953.
252. Russell, H., O'Toole, D. T., Bardsley, K., Davis, W. C., Ellis, J.A. 1996. Comparative Effects of Bluetongue Virus Infection of Ovine and Bovine Endothelial Cells. *Veterinary pathology* 33: 319-331.
253. Saegerman, C., Berkvens, D., Mellor, P. S. 2008. Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerging Infectious Disease* 14: 539-544.
254. Saegerman, C., Hubaux, M., Urbain, B., Lengele, L., Berkvens, D. 2007. Regulatory issues surrounding the temporary authorization of animal vaccination in emergency situations: the example of bluetongue in Europe. *Revue scientifique et technique Office International des Epizooties*: 395-413.
255. Salas de la Vega, R. 2005. Gestión de la cabra montés. Aplicación al caso de la provincia de Málaga. II Jornadas Zoológicas, Canillas de Aceituno, Málaga, marzo de 2005.
256. Samal, S.K., Livingstone, C.W.Jr., McConnell, S., Ramig, R.F. 1987. Analysis of mixed infection of sheep with bluetongue serotype 10 and 17: evidence for genetic reassortment in the vertebrate host. *Journal of Virology* 61: 1086-1091.
257. San José, C. 1997. Mamíferos de España. Corzo *Capreolus capreolus* (Linnaeus 1758). *Galemys*, 9(1): 3-8.
258. Sánchez-Cordón, P.J., Rodríguez-Sánchez, B., Risalde, M.A., Molina, V., Pedrera, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M., Gómez-Villamandos, J.C. 2010. Immunohistochemical detection of bluetongue virus in fixed tissues. *Journal of Comparative Pathology* 143: 20-28.
259. Santiago-Moreno, J., Toledano-Díaz, A., Gómez-Brunet A., López-Sebastián, A.

2004. El Muflón europeo (*Ovis orientalis musimon*, Schreber, 1782) en España: consideraciones históricas, filogenéticas y fisiología reproductiva. *Galemys* 16(2): 3-20.
- 260.Santiago-Moreno, J., Carvajal, A., Astorga, R.J., Coloma, M.A., Toledano-Díaz, A., Gómez-Guillamon, F., Salas-Vega, R., López-Sebastián, A. 2011. Potential impact of diseases transmissible by sperm on the establishment of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) genome resource banks. *European Journal of Wildlife Research* 57(2): 211-216.
- 261.Santman-Berends, I.M., van Wuijckhuise, L., Vellema, P., van Rijn, P.A. 2010. Vertical transmission of bluetongue virus serotype 8 virus in Dutch dairy herds in 2007. *Veterinary Microbiology* 141(1-2): 31-35.
- 262.Sapre, S. N. 1964. An outbreak of bluetongue in goats and sheep. *Veterinary Review* 15: 78-80.
- 263.Savini, G., Goffredo, M., Monaco, F., Di Gennaro, A., de Santis, P., Meiswinkel, R., Caporale, V. 2004. The isolation of bluetongue virus from field populations of the Obsoletus Complex in central Italy. *Veterinaria Italiana* 40(3): 286-291
- 264.Savini, G., Afonso, A., Mellor, P., Aradaib, I., Yadin, H., Sanaa, M., Wilson, W., Monaco, F., Domingo, M. 2011. Epizootic haemorrhagic disease. *Research in Veterinary Science* 91(1): 1-17.
- 265.Schmidt, K., Dressel, K.M., Niedrig, M., Mertens, M., Schüle, S.A., Groschup, M.H. 2013. Public Health and Vector-Borne Diseases - A New Concept for Risk Governance. *Zoonoses Public Health* doi: 10.1111/zph.12045.
- 266.Schwartz-Cornil, I., Mertens, P., Contreras, V., Hemati, B., Pascale, F., Bréard, E., Mellor, P.S., MacLachlan, J., Zientara, S. 2008. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Veterinary Research* 39(5): 46-62.
- 267.Scott, J.L., Oberst, R.D., Channell, M.B., Osburn, B.I. 1987. Genome segment reassortment between two serotypes of bluetongue virus in a natural host. *Journal of Virology* 61: 2670-2674.
- 268.Sellers, R.F., Taylor, W.P. 1980. Epidemiology of bluetongue and the import and export of livestock, semen and embryos. *Bulletin Office International des Épizooties* 92: 587-592.
- 269.Sellers, R.F. 1981. Bluetongue and related diseases. En: *Virus diseases of food animals*, vol 2. Gibbs, E.P.J. Ed. Academic, London, pp 567-584
- 270.Sellers R. F., Mellor P. S. 1993. Temperature and the persistence of viruses in *Culicoides* spp. during adverse conditions. *Revue scientifique et technique Office International des Épizooties* 12: 733-755.
- 271.Shimizu, S., Toyota, I., Arishima, T., Goto, Y. 2004. Frequency of serological cross-reactions between Ibaraki and bluetongue viruses using the agar gel immunodiffusion test. *Veterinaria Italiana* 40(4): 583-586.
- 272.Shimshony, A. 2004. Bluetongue in Israel - a brief historical overview.

- Veterinaria Italiana 40(3): 116-118.
273. Shope, R.E., Lester, M.D., McNamara, G., Mangold, R. 1960. A virus induced epizootic hemorrhagic disease of Virginia white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). Journal of Experimental Medicine 111: 155-170.
274. Singer, R.S., Boyce, W.M., Gardner, I.A., Johnson, W.O., Fisher, A.S. 1998. Evaluation of bluetongue virus diagnostic tests in free-ranging bighorn sheep. Preventive Veterinary Medicine 35(4): 265-282.
275. Siquier Vigrós, A. 2005. La Lengua azul en Baleares. La experiencia de dos focus (2000 y 2003). Información veterinaria, Monográfico Lengua Azul: 42-49.
276. Silbermayr, K. 2009. Máster Thesis: A risk assessment of Bluetongue disease in Austria. University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Viena, Austria, pp 1-39.
277. Smith, H., 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(3): 352-355.
278. St. George, T.D., Standfast, H.A., Cybinski, D.H., Dyce, A.L., Muller, M.J., Doherty, R.L., Carley, J.G., Filippich, C., Frazier, C.L. 1978. The isolation of a bluetongue virus from *Culicoides* collected in the Northern Territory of Australia. Australian Veterinary Journal 54(3): 153-154.
279. St. George, T.D., Cybinski, D.H., Standfast, H.A., Gard, G.P., Della-Porta, A.J. 1983. The isolation of five different viruses of the epizootic haemorrhagic disease of deer serogroup. Australian Veterinary Journal 60: 216-217.
280. Stallknecht, D.E., Kellogg, M.L., Blue, J.L., Pearson, J.E., 1991. Antibodies to bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses in a barrier island white-tailed deer population. Journal of Wildlife Diseases 27: 668-674.
281. Stallknecht, D.E., Davidson, W.R. 1992. Antibodies to bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses from white-tailed deer blood samples dried on paper strips. Journal of Wildlife Diseases 28(2): 306-310.
282. Stallknecht, D.E., Nettles, V.F., Rollor, E.A., Howerth, E.W. 1995. Epizootic hemorrhagic disease virus and bluetongue virus serotype distribution in white-tailed deer in Georgia. Journal of Wildlife Diseases 31(3): 331-338
283. Stallknecht, D.E., Howerth, E.W., Kellogg, M.L., Quist, C.F., Pisell, T. 1997. In vitro replication of epizootic hemorrhagic disease and bluetongue viruses in white-tailed deer peripheral blood mononuclear cells and virus-cell association during in vivo infections. Journal of Wildlife Diseases 33(3): 574-583.
284. Stallknecht, D.E. y Howerth, E.W. 2004. Epidemiology of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease in wildlife: surveillance methods. Veterinaria Italiana 40(3): 203-207.
285. 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(2): 367-371.
- 286.Stott, J.L., Osburn, B.I., Alexander, L. 1985. *Ornithodoros coriaceus* (pajaroello tick) as a vector of bluetongue virus. *American Journal of Veterinary Research* 46(5): 1197-1199.
- 287.Sugiyama, I., Shimizu, E., Nogami, S., Suzuki, K., Miura, Y., Sentsui, H. 2009. Serological survey of arthropod-borne viruses among wild boars in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 71(8): 1059-1061.
- 288.Szmaragd, C., Wilson, A., Carpenter, S., Mertens, P.P., Mellor, P.S., Gubbins, S. 2007. Mortality and case fatality during the recurrence of BTv-8 in northern Europe in 2007. *Veterinary Record* 16: 571-572.
- 289.Takamatsu, H., Burroughs, J.N., Wade-Evans, A.M., Mertens, P.P. 1992. Analysis of bluetongue virus serotype-specific and cross reactive ovine T-cell determinants in virus structural proteins En: *Bluetongue, African Horse Sickness and related Orbivirus*. Walton T.E., Osburn B.I. Ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA pp. 491-497.
- 290.Takamatsu, H., Mellor, P.S., Mertens, P.P.C., Kirkham, P.A., Burroughs, J.N., Parkhouse, R.M.E. 2003. A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector. *Journal of General Virology* 84: 227-235.
- 291.Takamatsu, H.H., Mellor, P.S., Mertens, P.P.C. 2004. A potential overwintering mechanism for bluetongue virus recent findings. *Veterinaria Italiana* 40(4): 456-461.
- 292.Tanya, V.N., Greiner, E.C., Gibbs, E.P.J. 1992. Evaluation of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus. *Veterinary Microbiology* 32: 1-14.
- 293.Temizel, E.M., Yesilbag, K., Batten, C., Senturk, S., Maan, N.S., Clement-Mertens, P.P., Batmaz, H. 2009. Epizootic hemorrhagic disease in cattle, Western Turkey. *Emerging Infectious Diseases* 15(2): 317-319.
- 294.Tessaro, S.V., Clavijo, A. 2001. Duration of bluetongue viremia in experimentally infected american bison. *Journal of Wildlife Diseases* 37: 722-729.
- 295.Theiler, A. 1906. Bluetongue in sheep. *Annual Report Direction of the Agriculture in Travel (1904-05)*: 110-121.
- 296.Thompson, L.H., Mecham, J.O., Holbrook, F.R. 1988. Isolation and characterization of epizootic hemorrhagic disease virus from sheep and cattle in Colorado. *American Journal of Veterinary Research* 49(7): 1050-1052.
- 297.Thorne, E.T., Williams, E.S., Spraker, T.R., Helms, W., Segerstrom, T. 1988. Bluetongue in free-ranging pronghorn antelope (*Antilocapra americana*) in Wyoming: 1976 and 1984. *Journal of Wildlife Diseases* 24(1): 113-119.
- 298.Ting, L.J., Lee, M.S., Huang, T.S., Huang, C.C., Kuo, S.T., Lee, F. 2005.

- Identification of bluetongue virus in goats in Taiwan. *Veterinary Record* 156: 152.
299. Tomori, O. 1980. Bluetongue and related viruses in Nigeria: experimental infection of West African dwarf sheep with Nigeria strains of the viruses of epizootic haemorrhagic disease of deer and bluetongue. *Veterinary Microbiology* 5(3): 177-185.
300. Torina, A., Caracappa, S., Mellor, P.S., Baylis, M., Purse, B.V. 2004. Spatial distribution of bluetongue virus and its *Culicoides* vectors in Sicily. 2004. *Medical and Veterinary Entomology* 18(2): 81-89.
301. Touil, N., Cherkaoui, Z., Lmrabih, Z., Loutfi, C., Harif, B., El Harrak, M. 2012. Emerging viral diseases in dromedary camels in the Southern Morocco. *Transboundary and Emerging Diseases* 59(2): 177-182.
302. Toussaint, J.F.; Sailleau, C., Breard, E., Zientara, S., De Clercq, K. 2007. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *Journal of Virological Methods* 140: 115–123.
303. Vega, S., Tolari, F., García, A., Gómez, T., Fernández, S., Galiana, C., Cavini, S., Pérez, T. 2005. *Lengua azul*. *Profesión Veterinaria* 60: 14-23.
304. Velic, L., Velic, R., Bajrovic, T., Dukic, B., Camo, D. 2004. Bluetongue in Bosnia: comparisons of competitive enzyme-linked immunosorbent assay and standard agar gel immunodiffusion tests. *Veterinaria Italiana* 40 (4): 562-563.
305. Venter, G.J., Labuschagne, K., Hermanides, K.G., Boikanyo, S.N.B., Majatladi, D.M., 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.
306. Venter, G.J., Wright, I.M., Del Rio, R., Lucientes, J., 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(3):320-326.
307. Veronesi, E., Hamblin, C. Mellor, P.S. 2005. Live attenuated bluetongue vaccine viruses in Dorset Poll sheep, before and after passage in vector midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Vaccine* 23: 5509-5516.
308. Verwoerd, D.W., Els, H.J., De Villiers, E.M., Huisman, H. 1972. Structure of the bluetongue virus capsid. *Journal of Virology* 10(4): 783-794.
309. Vosdingh, R.A., Trainer, D.O., Easterday, B.C. 1968. Experimental bluetongue disease in white-tailed deer. *Canadian Journal of Comparative Medicine Veterinary Science* 32(1): 382-387.
310. Wade-Evans, A.M., Romero, C.H., Mellor, P., Takamatsu, H., Anderson, J., Thevasagayam, J. 1996. Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripox virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus

- challenge. *Virology* 220: 227–231.
311. Whetter, L.E., Maclachlan, N.J., Gebhard, D.H., Heidner, H.W., Moore, P.F. 1989. Bluetongue virus infection of bovine monocytes. *Journal of General Virology* 70: 1663-1676.
312. White, D.M., Wilson, W.C., Blair, C.D., Beaty, B.J. 2005. Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects. *Journal of General Virology* 86: 453-462.
313. Wilson, A.J. y Mellor, P.S. 2009. Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 364(1530): 2669-2681.
314. Wilson, W.C., Hindson, B.J., O'Hearn, E.S., Hall, S., Tellgren-Roth, C., Torres, C., Naraghi-Arani, P., Mecham, J.O., Lenhoff, R.J. 2009. A multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of Bluetongue virus and Epizootic hemorrhagic disease virus serogroups. *Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation* 21(6): 760-770.
315. Wirth, W.W., Hubert, A.A. 1989. The culicoides of Southeast Asia (diptera: ceratopogonidae). *Memoirs of the American Entomology Institute* 44: 1-508.
316. Wittmann, E.J., Mellor, P.S., Baylis, M. 2001. Using climate data to map the potential distribution of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in Europe. *Revue Scientifique et Technique Office international des Epizooties* 20(3): 731-740.
317. Woolhouse, M.E.J., Gowtage-Sequeria, S. 2005. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerging Infectious Diseases* 11: 1842-1847.
318. Work, T.M., Jessup, D.A., Sawyer, M.M. 1992. Experimental bluetongue and epizootic hemorrhagic disease virus infection in California black-tailed deer. *Journal of Wildlife Diseases* 28: 623-628.
319. Yadin, H., Brenner, J., Bumbrov, V., Oved, Z., Stram, Y., Klement, E., Perl, S., Anthony, S., Maan, S., Batten, C., Mertens, P.P.C., 2008. Epizootic haemorrhagic disease virus type 7 infection in cattle in Israel. *Veterinary Record* 162: 53–56.
320. Zientara, S., Maclachlan, N.J., Calistri, P., Sanchez-Vizcaino, J.M., Savini, G. 2010. Bluetongue vaccination in Europe. *Expert Review of Vaccines* 9: 989-991.