

Sarah Angele Delacour Estrella

Estudio poblacional de *Aedes*
(*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse,
1894) en España: distribución,
genética y alternativas de control
biológico de la especie

Departamento
Patología Animal

Director/es
Lucientes Curdi, Javier
Collantes Alcaraz, Francisco

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

ESTUDIO POBLACIONAL DE AEDES (STEGOMYIA)
ALBOPICTUS (SKUSE, 1894) EN ESPAÑA:
DISTRIBUCIÓN, GENÉTICA Y ALTERNATIVAS DE
CONTROL BIOLÓGICO DE LA ESPECIE

Autor

Sarah Angele Delacour Estrella

Director/es

Lucientes Curdi, Javier
Collantes Alcaraz, Francisco

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Patología Animal

2018



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

Estudio poblacional de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) en España:
Distribución, genética y alternativas de
control biológico de la especie

Autor

Sarah Delacour Estrella

Director/es

Javier Lucientes Curdi
Francisco Collantes Alcaraz

Facultad de Veterinaria
2018



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

**Estudio poblacional de *Aedes (Stegomyia) albopictus*
(Skuse, 1894) en España: distribución, genética y
alternativas de control biológico de la especie.**

Memoria presentada por la licenciada

D^a. Sarah Delacour Estrella

Para optar al grado de Doctor

Dirigida por los Doctores

D. Javier Lucientes Curdi y

D. Francisco Collantes Alcaraz

Zaragoza, Mayo de 2018



Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza

UNIVERSIDAD DE
MURCIA



Dr. Javier Lucientes Curdi, Catedrático del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y **Dr. Francisco Collantes Alcaraz**, Profesor titular de Zoología de la Universidad de Murcia,

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada “**Estudio poblacional de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) en España: distribución, genética y alternativas de control biológico de la especie**”, presentada por la Licenciada en Ciencias Biológicas **D^a. Sarah Delacour Estrella**, ha sido realizada bajo su dirección, ajustándose al Proyecto de Tesis presentado y cumpliendo los requisitos exigidos en la legislación vigente para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Y para que conste,

En Zaragoza, mayo de 2018

Javier Lucientes Curdi

Francisco Collantes Alcaraz

A mi pequeña Gran Familia:
Mi madre y hermanos (Yves y Vicente),
Juan Carlos, Mireia y Elsa

AGRADECIMIENTOS

Llegado este momento, siento cierta emoción ante el hecho de dedicar unas palabras a todas aquellas personas que me han acompañado a lo largo de estos años de aprendizaje. Todos, de alguna manera habéis contribuido a que llegue este momento. Porque sin vuestra ayuda, sin vuestros ánimos todo habría sido más difícil.

En primer lugar, he de agradecer a mi tutor/director Javier Lucientes Curdi que me permitiera formar parte de su equipo y me brindara la oportunidad de enfrentarme a este reto que ha sido la realización de una tesis doctoral. Él supo ver en mí hace ya unos cuantos años ese algo que a menudo yo no veo. Ha hecho que le plantara cara a las situaciones que más me asustaban para finalmente aprender de ellas y crecer como persona y como profesional. Gracias Javier, por enseñarme tanto y por ser desde el principio un amigo más que un jefe.

Gracias a Francisco Collantes Alcaraz, por aceptar la codirección de esta tesis. Ha sido un ejemplo a seguir y me ha demostrado que no hay excusas, que hay que ser valiente y constante hasta llegar a la meta. Gracias Majo por tu paciencia y por esas correcciones con un toque de humor que hicieron el trabajo algo más ameno. ¡Creo que voy a seguir dándote guerra!

A Rosario Melero Alcibar, mi querida maestra, gracias por enseñarme a apreciar cada detalle de los mosquitos que aprendí a identificar. Con muchas anécdotas a nuestras espaldas y una gran amistad como premio, siempre ha caminado a mi lado de manera incondicional y me ha apoyado en cada paso que he dado a lo largo de los casi diez años de trabajo conjunto.

A Frédéric Bartumeus, del CSIC-CEAB. Gracias por ofrecerme formar parte de ese gran proyecto que es Mosquito Alert y que indirectamente me permitió conocer a grandes profesionales como tú, como Marc Ventura y Jenny Carter entre otros, con los que he aprendido mucho y he empezado a entender un poco más de genética de poblaciones. Gracias por vuestra paciencia y vuestro tiempo.

Al equipo de Pilar Moya del departamento de Ecología Química Agrícola de la Universidad Politécnica de Valencia por descubrirme el fascinante mundo de los hongos entomopatógenos y por ofrecerme la excusa perfecta para viajar a Valencia. Gracias Pilar, Ilde, Jaime y Guillermo.

A los compañeros del instituto de investigación Neiker, Ana García y Jesse Barandika, por los muestreos llevados a cabo por el norte del país y por permitirme incluir los descubrimientos en este trabajo.

A los responsables de Salud pública del Gobierno de Aragón, Francisco Javier Falo y Alberto Alcolea, gracias por confiar en nosotros para el diseño y desarrollo de la vigilancia de mosquito tigre en Aragón. Con mención especial para Pilar Cisneros mi compañera de viaje y ahora amiga. Gracias también a Luis Aranda por llevarnos siempre puntuales por el buen camino.

A Ignacio de Blas, por atenderme en cualquier momento de agobio y tener siempre una solución para cada problema. Gracias por tu buen humor en la realización del trabajo estadístico y burocrático, sin ti, creo aún estaría leyendo manuales.

A mi querida compañera Rosa Estrada por escucharme, animarme y asumir mucho más trabajo y así regalarme tiempo para dedicarme de lleno a la tesis. También gracias a ti ha llegado al fin este momento.

A los profesores de Parasitología, gracias a Juan Antonio Castillo, Chusa Gracia Salinas y Miguel Ángel Peribañez.

A David Bravo y a Adrián Ruiz, y las chicas de Elche, Salima, Fani y Alicia, así como a los demás compañeros de la Compañía de Tratamientos Levante (CTL) que me ayudaron en la labor de colocación de trampas de oviposición año tras año. Gracias por la logística y por la buena predisposición a colaborar en este proyecto.

No puedo olvidarme de todos aquellos que me acogisteis cuando llegué a Zaragoza y de aquellos que fuisteis apareciendo. Gracias Josemi, Rocío, Víctor, Angel, Pedro, Carlos Hedman y Susana Gracia; esas salidas al campo, esos cafés, esas cenas y bailes. Gracias por todos esos momentos que hicieron el día a día más llevadero. A la meua Aneta, a pesar de la distancia, tus palabras de cariño siempre me han acompañado. Por supuesto a Charly y Paula, las últimas incorporaciones aunque no las menos importantes, gracias por aguantarme en los últimos coletazos de éste trabajo. Gracias a todos por cada consejo y palabra de ánimo que me habéis aportado.

Gracias también a Mikel Bengoa, valiente emprendedor y verdadero profesional. Gran amigo con el que he compartido dudas, miedos y victorias. Hemos vencido obstáculos con dedicación y sin dejar de creer en lo que hacíamos. Es una gran persona con la que he tenido la suerte de compartir momentos fantásticos. ¡Seguro que vendrán muchos más!

A Sonia Ares, una gallina más de este corral en Zaragoza. ¡Grazas amiga! Por esa energía positiva que transmite, por ver siempre el vaso medio lleno y saber transmitirnoslo, así como hacer de la estadística algo entendible. ¡Somos un equipo!

A mis Pinypon, Adriana y Paz. No sé si conseguiré expresar con palabras lo mucho que me han aportado. Casi sin darnos cuenta nos hicimos amigas y el día a día en el trabajo con vosotras ha sido sin duda más feliz y gratificante. Adri, a pesar de la distancia has seguido estando muy presente. Esto se acaba y por fin llevaremos a cabo esos retos montañeros que nos planteamos cuando te convertiste en doctora. Paz, compañera en este viaje al centro de la producción científica. Esas risas a deshoras han sido la clave del éxito. Gracias por apoyarme como tía Paz en la última etapa.

No me olvido de mis Garrapateros y Pulgosos. Ignacio Ruiz, mi querido Nacho. Le debo muchas de mis capacidades adquiridas, a base de paciencia y muchas risas compartidas. ¡Además de descubrimientos emocionantes! Fue compañero y ahora sin duda Amigo. Gracias por estar siempre disponible y encontrar las palabras adecuadas para remontar el ánimo. Y por supuesto gracias a esa gran persona y amiga que es Ana Muñoz, por esos cafés improvisados y sus palabras alentadoras que siempre ofrece sin pedir nada a cambio.

A Mariatxu, por esas horas nocturnas en la biblioteca que sin duda fueron más productivas en compañía. Gracias por su buen humor y por esa fuerza de voluntad que contagia. "La perseverancia...secreto de todos los triunfos". ¡Este año es nuestro prima!

A mis amigas de aquí y de allá... Alba, Meri, Victoria, María, Marta, Dora, Cynthia, Alexia, Janina, por simplemente preguntar y animar, por estar ahí, siempre.

Gracias a mi madre y hermanos (Vicente e Yves), mis apoyos incondicionales que nunca han dejado de creer en mí y me regalan cada día palabras de cariño y fuerza. Encore merci!

Ya para terminar, quiero agradecer a mis niñas, Mireia y Elsa, por arrancarme una sonrisa incluso en los días más cansados. Por regalarme sonrisas y momentos para recargar la batería y seguir adelante. Y por supuesto, no puedo cerrar este apartado sin darle las gracias a Juan Carlos, mi compañero de camino, dispuesto a ayudarme a cada instante y a apoyarme en cada cosa que decido hacer. Gracias por cuidar siempre de nosotras y en especial durante este capítulo que está a punto de acabar. El cuento continúa...

No quiero olvidarme de nuestra querida perrita Yeira, quien me ha hecho mucha compañía en las largas horas de redacción de este trabajo.

“Je ne me souviens que d’un mur immense...

Mais nous étions ensemble, ensemble...nous l’avons franchi...

Souviens-toi...”

Jean- Jacques Goldman

“La perseverancia, secreto de todos los triunfos.”

Víctor Hugo

ACRÓNIMOS

ADN *Ácido desoxirribonucleico*

AMCA *American Mosquito Control Association*

ATBS *attractive toxic sugar baits*

Bti *Bacillus thuringiensis var. israeliensis*

CCAES *Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias*

CDC *Centers for Disease Control and Prevention*

CIV *Control Integrado de Vectores*

DDT *Dicloro Difenil Tricloroetano*

ECDC *Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades*

EDO *Enfermedades de Declaración Obligatoria*

EEUU *Estados Unidos de América*

EMCA *Asociación Europea de Control de Mosquitos*

EPA *Agencia de Protección Ambiental Americana*

ETV *Enfermedades Transmitidas por Vectores*

EVITAR *Enfermedades Víricas Infecciosas Transmitidas por Artrópodos y Roedores*

FAO *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*

GST *Enzimas Glutation S-transferasas*

HE *Hongos entomopatógenos*

IAEA *Organismo Internacional de Energía Atómica*

IC *Incompatibilidad Citoplasmática*

ICTV *Comité Internacional de Taxonomía de Virus*

IGR *Regulador de crecimiento de insectos*

ITS1 e ITS2 *Internal Transcribed Spacer 1 y 2*

LT50 *Letal Time 50*

MSSSI *Ministerio de Sanidad, Seguridad Social e Igualdad*

OMS *Organización Mundial de la Salud*

PAHO *Pan American Health Organization*

RAPD *Random Amplified Polymorphic DNA*

RFLP *Restriction Fragment Length polymorphism*

SIT *Steril Insect Technique Técnica del Insecto Estéril*

SNP *Single nucleotide polymorphism*

TII *Técnica del Insecto Incompatible*

ULV *Ultra Low Volume*

UV *Ultra Violeta*

WHO *World Health Organization*

ÍNDICE

Resumen	1
Summary	2
PRIMERA PARTE: ASPECTOS GENERALES.....	3
1. Introducción y justificación	5
2. Objetivos generales.....	7
3. Revisión bibliográfica.....	8
3.1. Situación taxonómica	8
3.1.1. Taxonomía de los <i>Aedini</i> (<i>sensu</i> Wilkerson y cols., 2015).....	8
3.2. Biología.....	9
3.3. Factores que afectan a la distribución.....	14
3.3.1. Distribución y dispersión.....	17
3.4. La era de las invasiones biológicas.....	21
3.4.1. Implicaciones sanitarias de los mosquitos invasores.....	23
3.5. Métodos de vigilancia y control.....	32
3.5.1. Vigilancia entomológica	32
3.5.2. Control integrado	33
3.6. Estudios genéticos	45
SEGUNDA PARTE: CAPÍTULO.....	48
I. Distribución de <i>Aedes albopictus</i> (Skuse, 1894) en España (2011-2016).....	50
I.1. Introducción	52
I.1.1. Factores que influyen en la distribución.....	52
I.1.2. Distribución geográfica conocida en España 2004-2010.....	53
I.1.3. Mosquito tigre y salud pública en España	55
I.1.4. Justificación y objetivos.....	56
I.2. Material y métodos.....	57
I.2.1. Descripción del área de estudio.....	57
I.2.2. Diseño general del estudio	58
I.2.2.4. Distribución de los puntos de muestreo.....	61
I.2.3. Análisis de datos	62

I.3. Resultados.....	63
I.3.1. Distribución temporal.....	63
I.3.2. Distribución espacial	70
I.3.3. Publicaciones derivadas de este apartado.....	85
I.4. Discusión.....	85
II. Estructura genética de poblaciones de <i>Aedes albopictus</i> detectadas en España (2011-2015).....	92
II.1. Introducción.....	94
II.1.1. Diversidad genética y las invasiones biológicas.....	94
II.1.2. La genética de poblaciones como herramienta de gestión.....	95
II.1.3. Estudios genéticos de <i>Ae. albopictus</i>	95
II.1.4. Justificación y objetivos.....	97
II.2. Material y métodos	98
II.2.1. Obtención del material entomológico.....	98
II.2.2. Análisis genéticos	99
II.2.3. Análisis de datos	100
II.3. Resultados	102
II.3.1. COI.....	102
II.3.2. ITS2	104
II.3.3. Análisis poblacionales.....	107
II.4. Discusión	110
III. Susceptibilidad de <i>Aedes albopictus</i> a la infección por hongos entomopatógenos.....	117
III.1. Introducción.....	119
III.1.1. Clasificación taxonómica.....	120
III.1.2. Mecanismo de infección	123
III.1.3. Antecedentes sobre el uso de <i>M. anisopliae</i> y <i>B. bassiana</i> como biocontroladores de culícidos	124
III.1.4. Justificación y objetivos	125

III.2. Material y métodos	126
III.2.1. Insectos empleados en el estudio	126
III.2.2. Hongos empleados en el estudio	126
III.2.3. Puesta a punto de los bioensayos	127
III.2.4. Análisis estadístico	131
III.3. Resultados	131
III.3.1. Bioensayo 1: Mortalidad inducida por los hongos entomopatógenos	132
III.3.2. Bioensayo 2: Efecto de la infección fúngica sobre la fecundidad y fertilidad de hembras de <i>Ae. albopictus</i>	136
III.4. Discusión.....	139
CONCLUSIONES GENERALES	143
BIBLIOGRAFÍA.....	147
ANEXOS.....	183
INDICE DE FIGURAS.....	201
INDICE DE TABLAS.....	204

Resumen

Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse, 1894), conocido comúnmente como mosquito tigre asiático, está reconocido como una de las especies más invasivas del mundo. Se registró por primera vez en España en 2004, cerca de la ciudad de Barcelona. Desde entonces, su distribución en nuestro país ha ido en aumento. Dado su papel como vector en los recientes brotes de arbovirus reemergentes en Europa y la creciente introducción de patógenos en España por viajeros, el Ministerio de Sanidad estableció un Plan Nacional de Vigilancia Entomológica.

En el presente trabajo de tesis se han caracterizado las poblaciones de mosquito tigre en España en el periodo 2011-2016.

En primer lugar, se ha estudiado su distribución, principalmente mediante la colocación de trampas de oviposición. Se ha observado una aceleración del proceso de ocupación del territorio por esta especie y se ha identificado su periodo anual de actividad en distintos municipios españoles.

En segundo lugar, se ha realizado un estudio genético de las poblaciones detectadas durante los últimos años de dispersión por el país. Mediante la utilización de dos marcadores moleculares (COI e ITS2), se ha podido determinar que existe una gran variabilidad genética poblacional en España y que la expansión geográfica ha tenido lugar tras múltiples y continuados procesos de colonización desde distintos orígenes, tanto nacionales como internacionales. Concretamente, los análisis de historia demográfica de la especie sugieren que la dispersión por España, ha tenido lugar a nivel local mediante procesos naturales y acelerada de manera artificial a escala nacional.

Finalmente, dado que actualmente se trata de realizar un manejo integrado de los vectores, se han realizado pruebas de susceptibilidad de *Ae. albopictus* a la aplicación de distintas cepas de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, que han mostrado su potencial como agentes de control biológico de esta especie.

Summary

The Asian tiger mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) has been described as one of the worst invasive species in the world. It was first registered in Spain in 2004 near Barcelona, Catalonia. Since then, the insect spread along the Spanish territory has been increasing. From the epidemiological point of view, it is important to know where and when this invasive vector is present, because it is involved in the last European outbreaks of arbovirus. Due to the increasing introduction of pathogens by travelers, the Spanish Ministry of Health has established a national plan of entomological surveillance.

The aim of this thesis is to define the tiger mosquito populations in Spain. For that the situation of the species has been studied in the period 2011-2016.

First, the tiger mosquito distribution has been studied, mainly using oviposition traps. An acceleration of dispersion over the years has been observed and its annual activity period has been registered in different Spanish municipalities.

Secondly, a genetic study of the populations detected during the last years of dispersion throughout Spain has been carried out. COI and ITS2 molecular markers have showed a great genetic variability with the presence of worldwide dominant haplotypes suggesting multiple colonization events. The demographic history of the species suggests local expansion by natural way and long-distance expansion accelerated by human activities.

Finally, because nowadays we look for an appropriate integrated management of vectors (combining strategies: reduce the use of chemical pesticides, manage waste disposal to eliminate potential breeding sites and use of biological control methods), the 3th study was carried out to evaluate different strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* as agents for biological control of *Ae. albopictus*.

PRIMERA PARTE:
ASPECTOS GENERALES

1. Introducción y justificación

Los mosquitos son uno de los grupos de insectos más conocidos debido a que originan problemas sanitarios al ser humano y sus animales domésticos. La necesidad biológica de las hembras de ingerir sangre ocasiona una pérdida importante de calidad de vida en aquellos lugares donde las densidades poblacionales de estos dípteros son muy elevadas (Halasa y cols., 2014). El problema no se limita a la molesta picadura sino que, a través de ésta, se pueden transmitir agentes infecciosos responsables de enfermedades.

Los mosquitos son dípteros que pertenecen a la familia Culicidae, que incluye a cerca de 3600 especies (www.mosquitocatalog.org; <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>). Prácticamente, tres cuartas partes del total se localizan en zonas tropicales y subtropicales donde la elevada humedad ambiental y diversidad de hábitats, favorece su desarrollo, supervivencia y evolución (Clements, 1992). Principalmente, dos subfamilias tienen importancia médica y veterinaria, los *Anophelinae* y los *Culicinae*, siendo ésta última la que engloba a la mayoría de géneros con relevancia médica (Service, 1996). La tribu de los *Aedini* es una de las más diversas de la familia, con más de 900 especies (un 25% del total), muchas de ellas con capacidad para transmitir virus y demás patógenos como Wilkerson y cols. (2015) recapitulan en su reciente trabajo.

La antropización y la explotación de los ecosistemas naturales, tiene consecuencias sobre las especies que en ellos habitan. Así pues, el ser humano ha modificado la interacción entre vectores y vertebrados reservorios y ha contribuido a que ciertos virus (la mayoría zoonóticos) transmitidos por vectores, hayan salido de sus ciclos selváticos y hayan sido transferidos a nuevos hospedadores vertebrados, entre los cuales se encuentra el hombre; desencadenando, si las condiciones lo permiten, epidemias a escala local o planetaria (principalmente en el trópico y de forma creciente en zonas templadas) (Jourdain y cols., 2015).

En las últimas décadas, el ritmo de los procesos de globalización ha aumentado considerablemente, facilitando e intensificando la propagación de especies exóticas invasoras definidas como “*especies cuya introducción accidental causa perjuicios económicos, medioambientales y sanitarios*” (Meyerson y Mooney, 2007), o como define el Real Decreto 630/2013, por el que se regula el Catálogo español de especies exóticas invasoras:

Especie exótica invasora: especie exótica que se introduce o establece en un ecosistema o hábitat natural o seminatural, y que es un agente de cambio y amenaza para la diversidad biológica nativa, ya sea por su comportamiento invasor, o por el riesgo de contaminación genética.

Desde el punto de vista sanitario, *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) es una de las especies de aedinos invasores que, junto a *Aedes aegypti* (L., 1762), *Aedes*

(*Hulecoeteomyia japonicus* (Theobald, 1901), *Aedes (Hulecoeteomyia) koreicus* (Edwards, 1917) y *Aedes atropalpus* (Coquillett, 1920), están ocasionando en Europa importantes problemas por picaduras. Además, su presencia supone un factor de riesgo epidemiológico debido a que son vectores competentes de varios patógenos exóticos (Medlock y cols., 2015). Finalmente, también son responsables de otra serie de perjuicios sanitarios, económicos y sociales derivados de la presencia de estas especies en nuevas áreas, como señalan diversos autores (Curcó y cols., 2007; Curcó y cols., 2008; Guasch, 2009; Halasa y cols., 2012; Worobey y cols., 2013; Halasa y cols., 2014).

Conocido comúnmente como mosquito tigre, *Ae. albopictus* es una especie originaria de las selvas tropicales del sureste asiático. La globalización actual, combinada con la plasticidad ecológica y fisiológica intrínseca de esta especie (Hawley, 1988), ha permitido que en las últimas décadas haya experimentado una importante dispersión geográfica a nivel global, lo que le ha convertido en una de las 100 especies más invasivas del mundo (página web del ISSG, 2011).

Fue detectado en España, por primera vez, en San Cugat del Vallés, Cataluña, en 2004 (Aranda y cols., 2006) como resultado de las molestias asociadas a su marcada antropofilia (Giménez y cols., 2007). Sin embargo, lo realmente destacable de la introducción y establecimiento de este mosquito es el riesgo de transmisión autóctona en España de arbovirus (acrónimo del inglés *Arthropod-Borne virus* lo que significa virus transmitidos por artrópodos) emergentes en Europa (Scholte y Schaffner, 2007; Schaffner y cols., 2013).

El consecuente interés por esta especie invasora ha generado la producción de diversos estudios de bioecología, resistencias a insecticidas, competencia vectorial y genética, permitiendo así identificar las características que hacen de este vector un excelente representante de las especies invasoras (Goubert y cols., 2016). Por lo tanto, dado la gran capacidad adaptativa de este vector, es importante profundizar en el conocimiento del estado actual de las poblaciones españolas, en todos sus aspectos como son su distribución, resistencia a insecticidas, genética de poblaciones, métodos de detección y lucha vectorial, etc., con el fin de plantear estrategias de control eficientes y, de esta forma, prevenir o reducir las molestias así como la transmisión de enfermedades (Medley y cols., 2015).

2. Objetivos generales

En este contexto, el objetivo principal del presente trabajo ha sido el seguimiento y estudio de las poblaciones de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) que colonizaron España. Los distintos estudios fueron diseñados para la obtención de datos de diversa naturaleza que ayuden a diseñar estrategias alternativas de vigilancia y gestión del vector y/o complementen las actualmente utilizadas. Para ello, se procedió al desarrollo y consecución de siguientes objetivos:

1. Conocer algunos de los datos biogeográficos básicos de *Ae. albopictus* en España: rango de distribución y modificación del mismo a lo largo del tiempo.
2. Conocimiento de la dinámica estacional de la especie en zonas geográficamente distantes.
3. Estudio de la estructura genética de algunas de las poblaciones de *Ae. albopictus* detectadas en España.
4. Estudio de la susceptibilidad de adultos de *Ae. albopictus* a la aplicación de hongos entomopatógenos como método de control biológico.

3. Revisión bibliográfica

3.1. Situación taxonómica

Aedes albopictus fue inicialmente descrito por Skuse (1894) como el “mosquito rayado de Bengala”, basándose en la morfología de ejemplares capturados en Calcuta (India). Debido a la pérdida de los ejemplares originales, se estableció un neotipo y una nueva descripción por Huang (1968).

La palabra *Aedes* viene del término griego *ἀηδής*, que significa “molesto, fastidioso, desagradable” (*beschwerlich* en el original) (Meigen 1818) y *albopictus* proviene del latín *albus* (=blanco) y *pictus* (=pintado) (Skuse, 1894).

Phylum Artropoda Latreille, 1829

Subphylum Hexapoda Latreille, 1825

Clase Insecta L., 1758

Orden Diptera L., 1758

Infraorden Culicomorpha Hennig, 1948

Familia Culicidae Meigen, 1818

Subfamilia Culicinae Meigen, 1818

Tribu Aedini Neveu-Lemaire, 1902

Género *Aedes* Meigen, 1818

3.1.1. Taxonomía de los Aedini (*sensu* Wilkerson y cols., 2015)

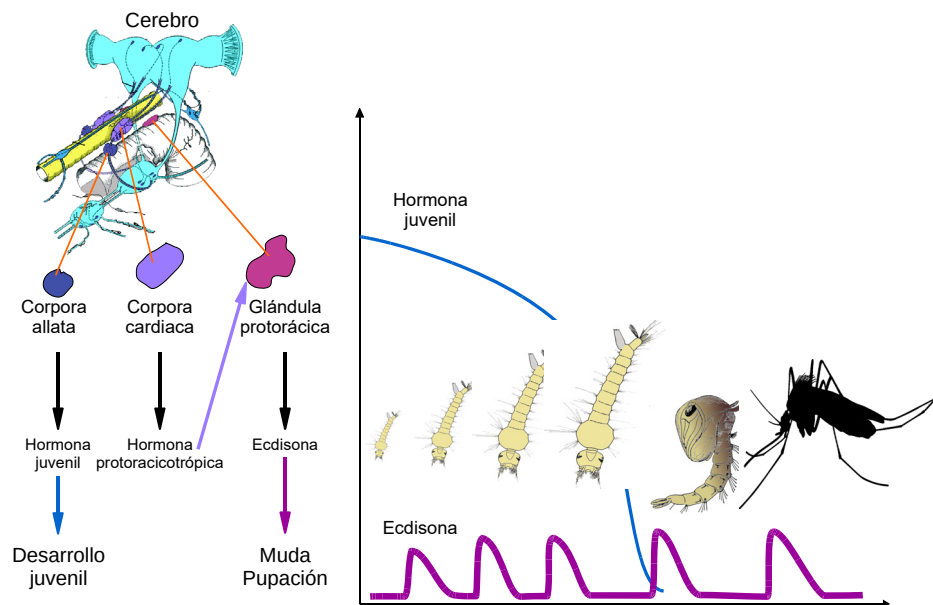
Durante la primera década del siglo XXI se ha desarrollado una clasificación filogenética de la tribu Aedini que ha resultado, sobre todo, en la división del género *Aedes* Meigen, 1818 en numerosos géneros. Los estudios han sido realizados principalmente por los autores Reinert y Harbach (Wilkerson y cols., 2015), que no consideran este género como monofilético. La mayoría de estos géneros provienen de la elevación del rango de los subgéneros existentes (junto a reordenación de los mismos) y creación de otros nuevos, como se puede consultar detalladamente en la web Mosquito Taxonomic Inventory, mantenida por Harbach (<http://mosquito-taxonomic-inventory.info>). La especie estudiada en este trabajo se mantuvo en el ahora elevado a rango de género *Stegomyia* por Reinert y cols. (2009).

Recientemente, la tribu *Aedini* fue revisada por Wilkerson y cols. (2015) con el fin de volver a una clasificación anterior más simplificada. Estos autores realizaron un estudio de parsimonia y señalaron que la filogenia propuesta por Reinert y cols. (2009) no era muy consistente. En este trabajo obtendremos por el emplear el término más aceptado, *Aedes albopictus*.

3.2. Biología

Los mosquitos son insectos con desarrollo holometábolo, presentando cuatro estadios larvarios y uno pupal, en el que se produce la metamorfosis completa para dar lugar al adulto. El proceso de muda o ecdisis que ocurre entre cada fase permite que las estructuras corporales aumenten de tamaño. Las mudas son reguladas por hormonas. En concreto, la hormona juvenil y la ecdisona (hormona de la muda) actúan de forma combinada. La hormona de los *corpora allata*, se conoce como hormona juvenil o neotenina y causa el mantenimiento de los caracteres larvarios. La ecdisona actúa en la epidermis iniciando la formación de una cutícula nueva y provocando la muda. A niveles altos de hormona juvenil y de ecdisona, se produce la muda y se obtienen larvas de mayor tamaño (Figura 1). Cuando el nivel de hormona juvenil disminuye se obtiene la pupa tras la muda. Finalmente, cuando desaparece la producción de hormona juvenil, tras la muda, eclosiona el adulto o imago.

Figura 1. Hormonas que regulan el desarrollo. Esquema del sistema nervioso. Modificado de Hartenstein, 2006



El adulto es un animal terrestre y volador, mientras que las fases inmaduras (larva y pupa) son acuáticas aunque con respiración aérea. Tras sumergirse el huevo, eclosiona la larva de primer estadio. Ésta es de pequeño tamaño (1mm) y presenta un diente de eclosión, una estructura esclerotizada detrás de la cabeza que le permite cortar la dura envoltura del huevo. Tanto larvas como pupas son móviles, contrariamente a muchos otros insectos cuyas pupas son inmóviles o muy poco móviles. Ambas deben realizar el intercambio gaseoso en la superficie mediante estructuras especializadas para ello (Figura 2). En las larvas existe un sifón abdominal terminal, mientras que las pupas presentan unas trompetas respiratorias a ambos lados del cefalotórax. Las larvas se alimentan principalmente de partículas en suspensión o depositadas en el fondo (microflora y detritos de origen animal y vegetal) (Clements, 1963). La pupa es el estadio de transición y, aunque móvil, no se alimenta. El tamaño del adulto estará

determinado, por tanto, por la cantidad de alimento que haya ingerido la larva y el tiempo de desarrollo de ésta, que vendrá determinado de forma proporcional a la temperatura ambiental (concepto de unidades calor o grados-días de Allen, 1976).

Tras el tiempo necesario para la metamorfosis, la cutícula de la pupa se desgarrar por una línea de ecdisis longitudinal dorsal en la zona cefalotorácica, como muchos otros insectos. La eclosión se produce en la superficie del agua y el adulto permanece durante unos minutos flotando hasta que sus alas se secan, se extienden y el exoesqueleto se endurece, emprendiendo entonces el vuelo.

Figura 2. Pupas y larvas de *Ae. albopictus* ©Roger Eritja



Los adultos de *Ae. albopictus* son de color negro y se caracterizan por presentar una línea mediodorsal longitudinal plateada en el tórax y la cabeza, lo que permite una diferenciación rápida de otras especies de culícidos (Figura 3). El relativo pequeño tamaño de los adultos así como la presencia de escamas blancas o plateadas en las patas y otras partes del cuerpo resaltan particularmente sobre el color negro general (Schaffner y cols., 2001). Sin embargo, existen algunas especies invasoras presentan patrones morfológicos similares aunque la coloración es más amarronada o amarillenta (*Ae. aegypti* o *Ae. japonicus*). *Aedes cretinus*, se encuentra restringido a la zona de Grecia, Chipre y Turquía y también presenta una característica línea media plateada que contrasta con el escutelo negro. No obstante, un estudio detallado del patrón de escamas torácicas permite la correcta diferenciación de su homólogo *Ae. albopictus*.

Los machos suelen eclosionar unas horas antes que las hembras para llevar a cabo la maduración sexual que le permitirá realizar la cópula. En sus primeras 24 horas de vida, el cuerpo del macho sufrirá una serie de transformaciones, principalmente el giro de 180° de la genitalia (Lamb, 1922) así como la maduración de las glándulas accesorias (Takken y cols., 2006). La cópula comienza cuando los machos usan el órgano de Tambour, correctamente llamado “*Antennal pulsating organ*” (Harbach y Knight, 1981) u órgano de Johnston (Johnston, 1855). Está localizado en las antenas, como

fonoreceptores para detectar las vibraciones alares del vuelo de las hembras (Day, 1955); se ha demostrado que los machos detectan 380 Hz de frecuencia provenientes del débil sonido producido por el vuelo de las hembras (Göpfert y cols., 1999). Esta frecuencia detectada por los machos, es la señal sexual primaria para la localización de una hembra para abordarla con precisión durante en vuelo (Roth, 1948). Los machos son atraídos por cualquier hembra en vuelo, independientemente de su edad cronológica y fisiológica. Son capaces de copular o intentar copular con hembras vírgenes o ya copuladas, o con hembras jóvenes o viejas (Oliva y cols., 2014). Ensayos de laboratorio realizados con *Ae. aegypti*, muestran que un macho es capaz de inseminar al 75% de las hembras copuladas durante los primeros 30 minutos de confinamiento (Roth, 1948). El único motivo por el que el macho detiene su comportamiento de cópula es por el agotamiento del esperma, que puede recuperar en, al menos, 3 días estando posado sin ninguna actividad física (Spielman, 1964).

Figura 3. Hemosucción de hembras de *Ae. albopictus*. ©Roger Eritja



Si las hembras no tienen al menos 40 horas de edad, no quedarán inseminadas (Akey, 1968). Durante la cópula, los machos no solo transfieren semen a la hembra sino también fluidos seminales con alto contenido proteico que afectan de forma importante a la biología y comportamiento de las hembras, aumentando incluso su supervivencia al copular con machos vírgenes. Helinski y Harrington (2011) anotaron, además, que cuantas más veces copula un macho de *Ae. aegypti*, menor es la fertilidad en las hembras con las que copula a lo largo del tiempo, debido al agotamiento del esperma.

La capacidad reproductiva (fecundidad y fertilidad) de las hembras está condicionada por la disponibilidad de alimento en las etapas larvarias así como por la densidad de la población que compite por los recursos. Así pues, una larva que haya dispuesto de alimento suficiente y temperatura constante dará lugar a un adulto de mayor tamaño, con más ovariolos por ovario y que podrá, por tanto, producir mayor número de huevos en su primer ciclo gonotrófico. El tamaño de la puesta a 25°C se ha

estimado alrededor de 150 y 175 huevos por hembra (Delatte y cols., 2009) oscilando entre 30-80 huevos en cada ciclo gonotrófico y disminuyendo con la edad. La duración de un ciclo varía entre 3,5 y 10 días dependiendo de la temperatura, siendo de aproximadamente 5 días a 25°C (Waldock y cols., 2013). El tamaño de los machos también tiene importantes consecuencias reproductivas ya que un menor tamaño provocará un retraso en la espermatogénesis y la calidad y cantidad del espermatozoide, repercutiendo negativamente sobre la fecundidad de las hembras como apuntan varios estudios al respecto (Helinski y Harrington, 2011; De Jesus y Reiskind, 2016).

Aedes albopictus es una especie multivoltina obteniendo entre 5 y 17 generaciones al año dependiendo de la disponibilidad de agua y la temperatura (Gatt y cols., 2009)

Ambos sexos se alimentan de jugos vegetales, pero sólo las hembras son hematófagas debido a la necesidad de sangre para la obtención de proteínas que favorezcan el desarrollo ovárico. Tras la cópula, la hembra se ve estimulada a picar para conseguir la sangre. Se alimentan mediante solenofagia, lo que implica que en el transcurso de la picada atraviesan la piel con la probóscide en busca de algún vaso sanguíneo. Al hacerlo, previamente a la succión, inoculan saliva que posee sustancias anestésicas, vasodilatadoras y anticoagulantes que hacen que el hospedador no sienta dolor en el momento de la picadura, a la vez que evitan la coagulación de la sangre y coadyuvan al aumento del flujo sanguíneo en la zona (Clements, 1992). Es esta saliva inyectada la que causa las reacciones que derivan en pápulas o habones. Por otro lado, es también la vía de transmisión de las enfermedades vectoriales. Muchos de sus componentes, son altamente inmunogénicos por lo que algunos autores sugieren que la saliva podría ser una herramienta inmuno-epidemiológica que permitiría evaluar el grado de exposición de una persona a la picadura de *Ae. albopictus* y por tanto, el riesgo de transmisión de arbovirus (Doucoure y cols., 2012).

Las preferencias tróficas de las hembras de *Ae. albopictus*, calificado habitualmente de generalista (Ponlawat y Harrington, 2005), están siendo muy estudiadas identificando con frecuencia que la especie se siente especialmente atraída por la sangre humana (Delatte y cols., 2010; Muñoz y cols., 2011; Kamgang y cols., 2012).

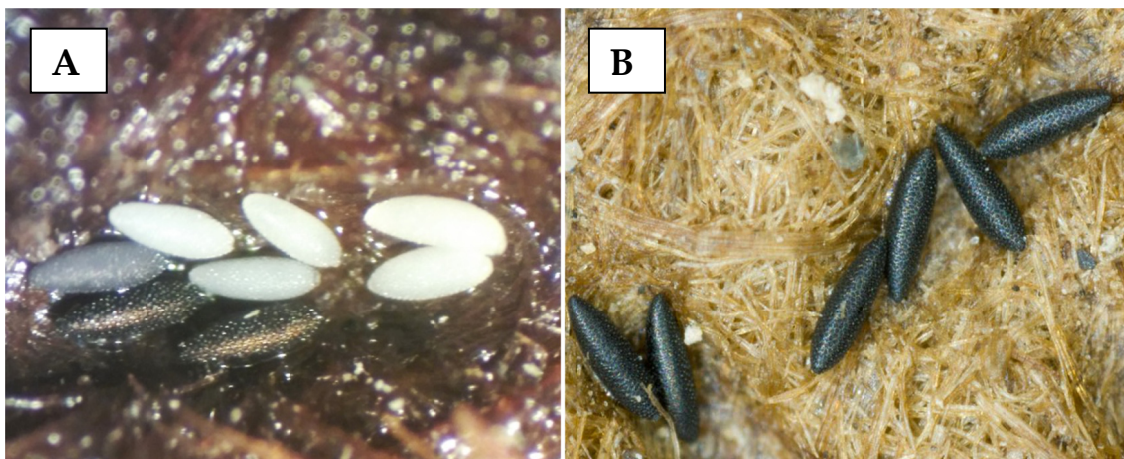
Se ha señalado que las hembras de mosquito tigre son exófilas y exofágicas (Delatte y cols., 2010). Pero en cuanto al segundo carácter, la realidad es que no dudan en entrar en las casas y en los vehículos cuando tienen necesidad de picar. Por otro lado, también se presenta a esta especie como diurna, con picos de actividad al amanecer y al atardecer, pero esto varía con las condiciones de cada zona. Por ejemplo, se ha encontrado picando por la noche en el interior de las casas (Collantes com. per.). Con el cambio estacional de las temperaturas, las épocas más cálidas acentúan estos dos picos de actividad pero, al avanzar el otoño y bajar las temperaturas, la actividad se ve desplazada hacia el mediodía.

Como se ha indicado, el ciclo biológico de los mosquitos está estrechamente ligado al medio acuático, pero *Ae. albopictus* es típicamente limnodendrófilo, por lo que tiene preferencia por pequeñas masas de agua retenidas en cavidades de troncos, rocas o

axilas de las ramas para la puesta de huevos. Entonces, no necesita grandes extensiones de agua como otras especies de culícidos. En el proceso de colonización de los ambientes urbanos, ha mostrado la capacidad de completar su ciclo en prácticamente cualquier recipiente artificial que retenga agua (macetas, floreros, latas e incluso neumáticos entre otros microhábitats acuáticos), que remedaría estos ambientes naturales originales. Por otro lado, de este modo limitaría la competencia por los recursos con larvas de otras especies así como el contacto con posibles depredadores (Hawley, 1988). De modo que, a nivel mundial, el mosquito tigre se puede considerar una especie sinantrópica.

Las hembras depositan sus huevos directamente sobre el sustrato, ligeramente por encima de la superficie del agua. El desarrollo embrionario de los huevos tiene una duración aproximada de entre tres y catorce días dependiendo de la temperatura y humedad relativa a la que están expuestos (Hawley, 1988). En el momento de la ovoposición, el huevo es de color blanco y conforme se endurece va oscureciendo hasta obtener un color negro intenso brillante (Figuras 4A y B).

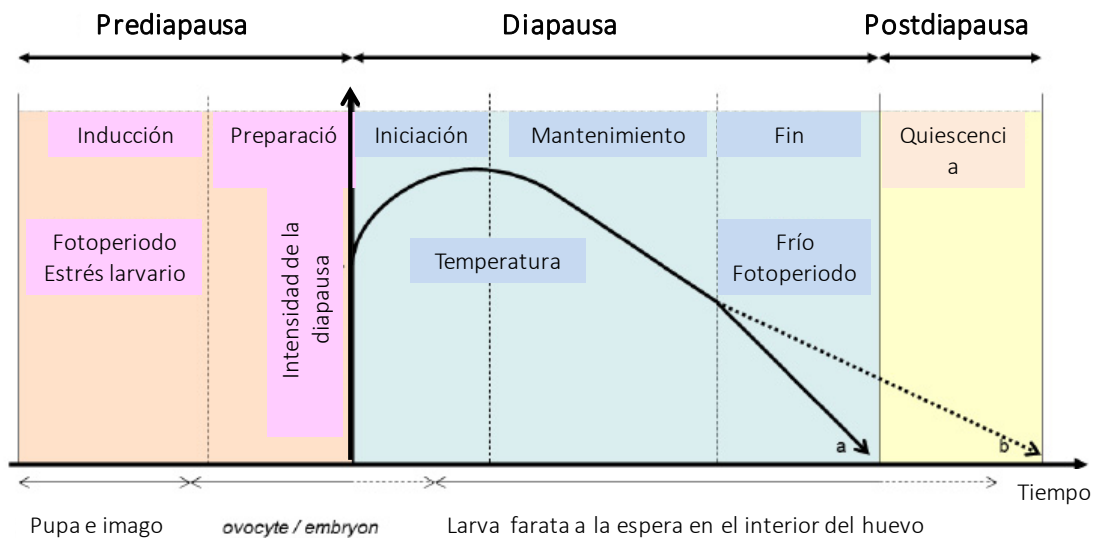
Figura 4. Huevos de *Ae. albopictus*. A: detalle del cambio de coloración con el paso del tiempo. B: huevos ya endurecidos y oscurecidos ©Roger Eritja



Parte del éxito del proceso de adaptación a zonas templadas y subtropicales reside en que las hembras de *Ae. albopictus*, pueden producir huevos de diapausa. Como respuesta a ciertos estímulos externos, principalmente el fotoperiodo y la temperatura, las hembras inducen una señal para activar la diapausa en sus oocitos que perdura a lo largo de todo el desarrollo embrionario. Entonces, la larva farata de primer estadio se queda quiescente en el interior del corion del huevo (Denlinger y cols., 2016). Sin embargo, se ha observado que las poblaciones tropicales de esta especie invasora no entran en diapausa (Hawley 1988; Urbanski y cols., 2010) pero es posible que se inactiven o queden en estado latente en respuesta a algún estrés como puede ser un cambio brusco en la temperatura (Denlinger y Armbruster, 2014). Ya desde que se encuentra en el estadio de pupa, la hembra es fotosensitiva y puede inducir el proceso de diapausa a la descendencia de su primer ciclo gonotrófico (Lacour y cols., 2015).

El proceso de diapausa se divide en distintas fases sucesivas (Košťál, 2006), la pre-diapausa (que incluye las fases de inducción (iniciación) y preparación), la diapausa propiamente dicha (que engloba las fases de inducción, mantenimiento y terminación) y por último la post-diapausa (quiescencia post-diapausa) (Figura 5).

Figura 5. Esquema de las fases de la diapausa del huevo de *Ae. albopictus*. Adaptado de Lacour 2016, a su vez modificado de Kostal, 2006



Los huevos en diapausa son más grandes y poseen mayor cantidad de lípidos que los huevos no diapausantes, probablemente debido al aumento en la expresión de los genes codificantes para la reserva de lípidos así como una menor expresión de los genes implicados en la movilización de lípidos durante la pre-diapausa (Reynolds y cols., 2012). Durante la fase de diapausa *sensu stricto*, el desarrollo embrionario se ve ralentizado (Lacour y cols., 2014) y el insecto ya no responde a estímulos ambientales (Denlinger y Armbruster, 2014). Serán, por, tanto embriones mucho más tolerantes a estrés, desecación y bajas temperaturas. Y esto parece determinado por el aumento de hidratos de carbonos en la superficie del huevo así como el aumento en el acumulo de ácidos grasos en la pre-diapausa (Hanson, 1995; Urbanski y cols., 2010). Finalmente, la diapausa termina con un periodo de quiescencia post-diapausa en el cual el insecto sigue inactivo, su metabolismo sigue siendo bajo pero el embrión es totalmente capaz de responder a estímulos ambientales que reactiven el desarrollo. Cuando las temperaturas superan un cierto umbral y/o el oxígeno disuelto en el agua disminuye, toda la población puede sincronizarse y emerger de forma simultánea (Denlinger y Armbruster, 2014).

3.3. Factores que afectan a la distribución

Diversos factores bióticos y abióticos afectan a la biología y, por tanto, a la distribución de *Ae. albopictus*. Los más estudiados han sido los ambientales como la temperatura, la precipitación, competencia inter e intraespecífica larvaria así como disponibilidad de alimento para adultos y larvas y el fotoperiodo (Alto y Juliano, 2001;

Delatte y cols., 2009; Roiz y cols., 2010; Brady y cols., 2013; Lacour y cols., 2014; Costanzo y cols., 2015).

Se ha señalado la temperatura como el factor más limitante debido a que son seres poiquiloterms por lo que las variaciones térmicas afectan al tamaño, a la supervivencia, distribución, fecundidad y capacidad vectorial. En la literatura existe mucha variabilidad a nivel mundial en cuanto a la relación entre la temperatura y la longevidad de los estadios (Brady y cols., 2014; Delatte y cols., 2009). A lo largo del ciclo térmico (circadiano o estacional) algunos umbrales fisiológicos se sobrepasan alcanzando temperaturas críticas (mínimas y máximas). La temperatura para la supervivencia óptima de las larvas y las pupas oscila alrededor de 25-30°C. Se observa una mortalidad muy elevada a temperaturas por debajo de 15°C o superiores a 36°C (Waldock y cols., 2013). Así, a 30°C las larvas terminan su desarrollo entre 5-7 días, 5-10 si se encuentran a 25°C y 7-13 días a 20°C, todo ello condicionado por la disponibilidad de alimento y densidades poblacionales (Hawley 1988; Estrada-Franco y Craig, 1995). Se estima que las larvas no sobreviven a temperaturas por debajo de 10°C ni cercanas a los 40°C (Waldock y cols., 2013). La pupa da lugar a imagos macho en aproximadamente 32-36 horas y a hembras en 49-52 horas a temperaturas próximas a los 25°C (Estrada-Franco y Craig, 1995). Su desarrollo oscila entre 1.7 y 8.5 días en intervalos térmicos de 15 a 36°C, determinando las temperaturas críticas que inducen la muerte a 10°C y 37°C.

A mayor temperatura mayor crecimiento poblacional (Alto y Juliano, 2001). Sin embargo, este hecho induce un desarrollo más rápido y en consecuencia un menor tamaño corporal, menor fecundidad y menor resistencia a inanición debido a la carencia de reservas (Reiskind y Zarrabi, 2011; Morales-Vargas y cols., 2013). La longevidad de los adultos se incrementa a bajas temperaturas (17°C) debido a que los mosquitos obtienen, almacenan y gastan de forma diferente las reservas de energía. Los mosquitos que se desarrollan a bajas temperaturas suelen tener mayor tamaño, ingieren por tanto mayor cantidad de sangre, obteniendo mayor cantidad de proteínas, lípidos y glicógeno en sus ovarios y desarrollan mas huevos con niveles mayores de lípidos que le aportará ventajas a la hora de enfrentarse a condiciones adversas (Waldock y cols., 2013).

Los estudios realizados en isla Reunión (Delatte y cols., 2009) anotaron que las hembras sobreviven una media de 30 días y los machos 18 a 25°C, observándose el máximo de supervivencia a 15°C y el mínimo a 35°C. El umbral mínimo de desarrollo se estimó a 10,4°C y el máximo a 40°C. Sin embargo, aunque no se produzca desarrollo por debajo de la temperatura mínima, se observó eclosión de huevos a 5°C.

El origen de las cepas influye de forma considerable en la resistencia a temperaturas extremas. Así, los huevos procedentes de poblaciones europeas de origen templado pueden aguantar durante 24h temperaturas de -10°C y si los huevos han entrado en diapausa son capaces de aguantar temperaturas de -10°C (durante 12-24h) y -12°C (una hora). En cambio, los huevos de origen tropical, podrían aguantar largos periodos de

tiempo a -2°C y hasta -7°C durante cortos periodos de tiempo (Thomas y cols., 2012). Más recientemente, algunos autores han descrito la posibilidad de que los huevos resistan temperaturas de -19°C en la nieve, debido a que ésta actúa como aislante (Armstrong y cols., 2017).

En Europa, recientemente se han realizado estudios acerca de los parámetros que influyen en su fenología, especialmente en Italia, donde *Ae. albopictus* ha colonizado multitud de ambientes muy dispares. Roiz y cols. (2010) estimaron en el norte de Italia que el periodo de actividad de las hembras se iniciaba con temperaturas mínimas de entre $12,6^{\circ}\text{C}$ y $13,5^{\circ}\text{C}$ y finalizaba al alcanzar temperaturas mínimas entre $8,5^{\circ}\text{C}$ y $9,5^{\circ}\text{C}$. Anteriormente en Roma, Toma y cols. (2003) también habían descrito un umbral aproximado de 11°C .

Hay que resaltar que dado que esta especie tiende a criar en ambientes resguardados, como pueden ser los imbornales de las ciudades, las condiciones térmicas internas difieren de las externas favoreciendo el desarrollo de los distintos estadios de la especie como reflejan Vallorani y cols. (2015). Así, los adultos pueden seguir activos en su interior durante el invierno (Romi y cols., 2006). Pero, además, en áreas más templadas de Europa se ha observado el mantenimiento de la actividad reproductora al aire libre en pleno invierno (Collantes y cols., 2014.).

El fotoperiodo también desencadena cambios importantes en la ecología de los mosquitos. Como ya se ha indicado, induce la diapausa y repercute sobre el tiempo de desarrollo, el tamaño corporal y dinámica poblacional (Lounibos y cols., 2002; Leisnham y cols., 2011; Yee y cols., 2012; Lacour y cols., 2015; Costanzo y cols., 2015), y todo ello puede repercutir sobre la capacidad de transmitir enfermedades. Fonseca y cols. (2015) demostraron que las hembras expuestas a un fotoperiodo corto ovipositan los huevos acumulados en un mismo recipiente, mientras que las que están expuestas a más horas de luz, tienden a dispersar la puesta por distintos recipientes. Este hecho probablemente condiciona los procesos de expansión geográfica de la especie.

A lo largo del periodo de expansión de *Ae. albopictus*, se han ido proponiendo diversos modelos predictivos de potenciales zonas de dispersión, basados en factores climáticos, principalmente temperaturas y pluviometría. En éstos, el sur de España no se consideró una zona adecuada para el establecimiento de la especie (Medlock y cols., 2015). Sin embargo, en esta última década se ha podido comprobar que estas variables macroclimáticas no son los únicos factores determinantes (Collantes y cols., 2014). Para realizar mapas de riesgo de expansión más fiables habría que considerar otras variables como el uso que se hace del agua sobre todo en áreas con problemas importantes de sequía, en las que se tiende a acumular agua en recipientes. Ésta disponibilidad de focos de cría suponen una ventaja a tener en cuenta a la hora de estimar las probabilidades de colonización y establecimiento de la especie en ciertas zonas *a priori* improbables. Roche y cols. (2015) incluyeron el uso del suelo como una variable más añadida a los modelos. Ese mismo año, Roiz y cols. (2015) anotaron que las densidades de hembras aumentan considerablemente tras registrarse

precipitaciones intensas incrementando así el riesgo de transmisión de arbovirus en el sur de Francia.

3.3.1. Distribución y dispersión

El alcance del vuelo se ha estudiado con técnicas de marcado-liberación-recaptura, observándose que el 90 % de los especímenes se dispersaron menos de 100 metros, aunque la distancia máxima de dispersión estimada para hembras es de 525 metros, y en machos de 225 metros (Niebylsky y Meek, 1992). La mayoría de estudios describen que la dispersión natural varía de 200-500 m (Hawley 1988; Lacroix y cols., 2009 y Marini y cols., 2010,) pero Honorio y cols. (2003) anotaron en sus experimentos en Brasil rangos de desplazamiento superiores a 800m.

A pesar de su corto rango de vuelo (Hawley, 1988), esta especie se ha podido detectar en países de los 5 continentes a excepción de la Antártida. Desde Asia se ha dispersado a Europa, África, Oriente medio, Norteamérica, Sudamérica y el Caribe (Knudsen, 1996; Gratz, 2004).

Se señala al Sudeste Asiático como el área original de *Ae. albopictus*, desde donde produjo una primera expansión a las islas del Índico y del Pacífico. Posteriormente, se expandió a la India (donde es descrito por Skuse, 1894), China y hacia Japón, cuyas referencias señalan, al menos, una llegada anterior a la Segunda Guerra Mundial (Hotta 1998). Previamente a la gran expansión producida en las dos últimas décadas del siglo XX y primera del XXI (Paupy y cols., 2009), las poblaciones más septentrionales se localizaban en Pekín en China (Feng, 1938), Seúl en Corea y Sendai (isla de Honshu) en Japón (Huang, 1968).

Algunos investigadores observaron que sucesivas introducciones tenían lugar en los Estados Unidos continentales procedentes de puertos asiáticos (Pratt y cols., 1946; Eads, 1972; Reiter y Darsie, 1984). En 1985, se descubrió un importante foco larvario en Houston (Texas) (Sprenger y Wuithiranyagool, 1986). Se considera que la introducción de esta especie se produjo por neumáticos usados procedentes del norte de Asia (Craven y cols., 1988) y, de hecho, los experimentos realizados en cuanto a resistencias al frío y fotoperiodo así lo corroboran (Hawley y cols., 1987). Desde este momento, se fue descubriendo la presencia de esta especie en numerosos estados y condados de Estados Unidos (Moore, 1999) como consecuencia del intenso intercambio comercial interno al país además de nuevas y constantes introducciones procedentes de Japón/Asia (Manni y cols., 2017; Armstrong y cols., 2017) (Figura 6).

En 1986, Forattini describió en Sao Paulo lo que iba a ser la primera plaga de mosquitos tigre en Brasil, aparentemente procedente de Asia tropical. (Hawley y cols., 1987). Años después, en 1988, se detectó por primera vez en México en Matamoros (Tamaulipas), cerca de la frontera con EEUU (CDC, 1989). Posteriormente, su presencia fue registrada en varios países centroamericanos como El Salvador (Reiter, 1998), Honduras, Costa Rica y Panamá (Lounibos, 2002), así como en el Caribe: Santo Domingo (República Dominicana) (Peña, 1993), La Lisa (Cuba) (Broche, 1999) y Haití

(Marquetti Fernández y cols., 2012). En años sucesivos, se detectó en Guatemala (Ogata y López Samayoa, 1996), Bolivia y Colombia (Reiter, 1998) y Argentina (Rossi y cols., 1999). Actualmente, el mosquito tigre se ha detectado en todos los países del centro y Sudamérica excepto en Chile.

En el Pacífico, esta especie invasora se citó en las islas Salomon (1980), en Fiji (1990) y, posteriormente, en 1994 en Papúa Nueva Guinea. Años después, se encontró en la isla australiana de Torres Strait (Ritchie y cols., 2006). En Nueva Zelanda, se comenzó la vigilancia durante 1993-94, detectándose la presencia de *Ae. albopictus* en Auckland y Littleton en neumáticos usados procedentes de Japón (Laird y cols., 1994; Derraik, 2004). Finalmente, en 2012, Guillaumot y cols., realizaron una investigación más detallada de la distribución del mosquito tigre en los países y territorios del Pacífico sur y añadieron Tonga (2011) a la lista de lugares donde el vector estaba presente.

Aparte de su dispersión en el océano Índico, antes de los años 80, (Madagascar, Seychelles, Marianas, La Reunión), la primera detección en este continente africano data de 1990 en Ciudad del Cabo (Sudáfrica), pero fue rápidamente controlado y no llegó a establecerse (Cornel y Hunt, 1991). Está citado, además, en Nigeria (Savage y cols., 1992), Bioko (Guinea Ecuatorial) (Toto y cols., 2003), en Camerún (Fontenille y Toto, 2001), en Gabón (Coffinet y cols., 2007), República Centroafricana (Diallo y cols., 2010), en el Congo (Kelvin y cols., 2011) y, muy recientemente, en Mozambique (Kampango y Abilio, 2016). Sin embargo, a pesar de la proximidad del norte de África a zonas infestadas por *Ae. albopictus*, la especie solo se ha citado en Argelia (Izri y cols., 2011; Lafri y cols., 2014; Benallal y cols., 2016) y Marruecos (Bennouna y cols., 2016), señalando la marcada acción de barrera del desierto del Sahara

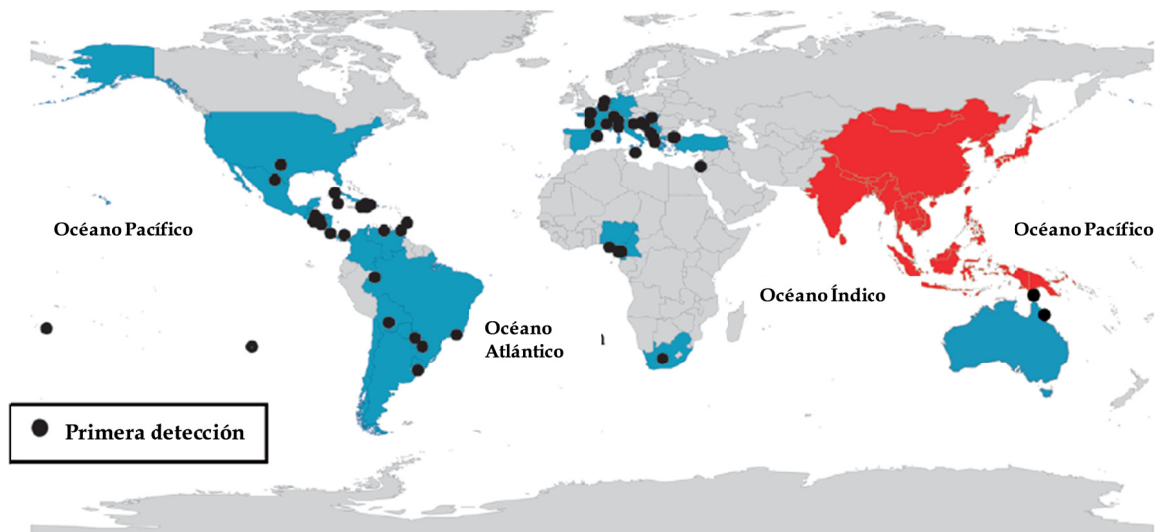
En Oriente Medio, se encuentra presente en Israel (Pener y cols., 2003), Líbano y Siria (Haddad y cols., 2007). Alrededor del Mar Negro, en Turquía y Georgia (Akiner y cols., 2016).

En Europa, la primera detección fue en una pequeña ciudad de Albania en 1979 (Adhami y Murati, 1987). Probablemente, la especie fue introducida en mercancías desde China a través del puerto de Dürres (Adhami y Reiter, 1998, Manni y cols., 2017). En 1990, se capturó un ejemplar en Génova (Italia) (Sabatini y cols., 1990) y, tan solo un año después, en Padua (Dalla Pozza y Majori, 1992). Desde entonces, prácticamente toda la geografía italiana ha sido colonizada por este vector (Romi y cols., 2008; ECDC, 2009) a consecuencia del intensivo intercambio comercial de neumáticos con Estados Unidos (Dalla Pozza y Majori, 1992), así como relaciones comerciales con las islas del Océano Índico (Manni y cols., 2017).

Se sospecha que la dispersión a través del continente europeo tuvo lugar a partir de las constantes introducciones acontecidas en Italia (Knudsen y cols., 1996). De hecho, muchos países se sumaron a la iniciativa de realizar una vigilancia entomológica ante el riesgo de introducción accidental del vector. En Francia, en 1994, las labores de vigilancia entomológica se iniciaron en zonas fronterizas con Italia. Sin embargo, se detectó por primera vez en Normandía y Poitou-Charentes en 1999 (Schaffner y Karch,

2000). Estas primeras localizaciones fueron erradicadas mediante tratamientos con plaguicidas pero, en 2005, se detectaron nuevas poblaciones al sur de Francia (Schaffner, 2006). Bélgica se vio afectada en el año 2000 al encontrarse *Ae. albopictus* en un almacén de reciclaje de neumáticos procedentes de Francia (Schaffner y cols., 2004) pero parece que las condiciones ambientales no fueron propicias para su asentamiento. En 2001, se registró por primera vez en Serbia y Montenegro, en almacenes de neumáticos procedentes de Alemania e Italia (Petric y cols., 2001). En Suiza, se capturó por primera vez en 2003, gracias a un programa de vigilancia (Flacio y cols., 2004). Se ha continuado detectando infestaciones procedentes de Italia por vía terrestre (Wymann y cols., 2008). En Grecia, se detectaron poblaciones en 2003 en la isla de Corfú y en Igoumenitsa, cerca de la frontera con Albania, aunque parece que la especie ya estaba presente desde hacía unos años (Samanidou-Voyadjoglou y cols., 2005). En España, fue detectado por primera vez en el año 2004, en la localidad barcelonesa de San Cugat del Vallés (Aranda y cols., 2006), probablemente importado en vehículos a través de la autovía del Mediterráneo. En Croacia, se detectó en Zagreb en 2004 (Klobucar y cols., 2006). En 2005 en Holanda, a través de la importación de la planta *Dracaena braunii* (Engl.) (= *Dracaena sanderiana* Sander), conocido como el “Bambú de la suerte”, desde el sur de China (Scholte y cols., 2007 a,b). En Eslovenia y en Bosnia y Herzegovina se detectó en 2005 (Petric y cols., 2006), aunque se desconoce mucho acerca de estas introducciones. En Alemania, se han ido citando desde 2007 múltiples capturas del vector (Pluskota y cols., 2008; Werner y cols., 2012; Becker y cols., 2013; Kampen y cols., 2013) aunque no se le ha considerado oficialmente establecido hasta hace muy poco (Walther y cols., 2017).

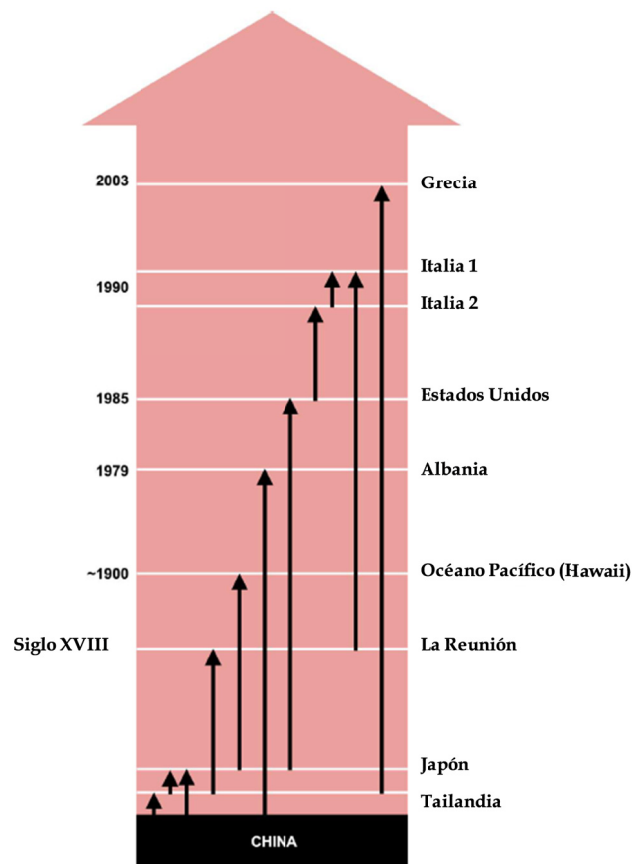
Figura 6. Distribución actual conocida de *Ae. albopictus*. En rojo región nativa, en azul distribución actual basada en referencias bibliográficas. Los puntos señalan la localización de la primera detección en cada país. Modificado de Aguirre-Obando y Navarro-Silva, 2017



Recientemente Inglaterra se ha unido a la lista de países en los que esta especie invasora ha sido detectada, el pasado año se localizó una presencia en una trampa en la estación de servicio de Folkestone, cerca del Eurotúnel (Medlock, 2017). Finalmente, en 2017, también se ha detectado mosquito tigre en Portugal (Maratubo y Rebelo, 2018; Costa-Osório y cols., 2018). Son ya 28 los países europeos en los que se ha detectado la presencia de *Ae. albopictus*, sin embargo solo se considera establecido en 21 de ellos (ECDC, 2017).

Después de muchos años de observaciones y estudios científicos sobre esta especie, existen propuestas comunes referentes a su modo de expansión geográfica que puede darse de forma natural (a pesar de su corto rango de vuelo) a nivel local y mediante saltos de dispersión a gran distancia, mediados por el transporte pasivo de huevos o larvas en mercancías y de adultos en vehículos. Moore y Mitchell (1997) sugirieron su desplazamiento artificial a media distancia por transporte rodado en EE.UU y, posteriormente también Roche y cols. (2015) en Francia así como Collantes y cols. (2015) en España, a través de la autovía A7. Recientemente, Eritja y cols. (2017) han aportado evidencias concluyentes acerca de estas hipótesis a partir de la integración de los datos de muestreos en coches y las imágenes enviadas por los ciudadanos al proyecto *Mosquito Alert* (antes *Atrapa el Tigre.com*).

Figura 7. Dispersión temporal de *Ae. albopictus* desde su zona originaria. Modificado de Manni y cols., 2017



3.4. La era de las invasiones biológicas

Existe gran controversia en cuanto a la definición de especie invasora (Colautti y MacIsaac, 2004). Uno de los criterios más señalados, que las diferencia del resto de especies exóticas, es su potencial o real perjuicio que produce su situación alóctona. En este sentido, Juliano y Lounibos (2005) identifican como invasoras a aquellas que producen un impacto en las comunidades nativas y como simples exóticas o no nativas a las que a aquellas que se establece en un lugar alejado de su origen sin mayores consecuencias.

La legislación española, el Real Decreto 630/2013 distingue las especies exóticas invasoras de las meramente exóticas:

“Especie exótica invasora: especie exótica que se introduce o establece en un ecosistema o hábitat natural o seminatural, y que es un agente de cambio y amenaza para la diversidad biológica nativa, ya sea por su comportamiento invasor, o por el riesgo de contaminación genética.”

Especie exótica o alóctona: se refiere a especies y subespecies, incluyendo sus partes, gametos, semillas, huevos o propágulos que pudieran sobrevivir o reproducirse, introducidos fuera de su área de distribución natural y de su área potencial de dispersión, que no hubiera podido ocupar sin la introducción directa o indirecta, o sin el cuidado del hombre.

Aunque no lo incluye en la definición, por el marcado carácter ambientalista de este real decreto, sí se señala en el preámbulo que las especies consideradas invasoras pueden causar perjuicios a la economía y a la salud pública. Este sería el caso del mosquito tigre, más un problema sanitario e incluso económico más que medioambiental.

El ritmo del intercambio comercial y del turismo, ha aumentado considerablemente en la era actual y con ello las posibilidades de introducir nuevas especies en los ecosistemas. Además, el calentamiento global, con inviernos más cálidos, facilita el establecimiento de algunas de ellas. Los organismos poiquilotérmicos, que ven condicionada su temperatura corporal en función de la ambiental se ven especialmente afectados, y entre ellos se incluyen los artrópodos, muchos de ellos relacionados con la transmisión de enfermedades al hombre y a los animales. Por lo general, los artrópodos responden al aumento de las temperaturas propagándose y ocupando nuevos hábitats favorables, exhibiendo procesos fisiológicos alterados que incluyen desde índices reproductivos mayores, el aumento de la longevidad así como un aumento en el consumo de alimentos, favoreciendo así la transmisión de patógenos ya que se reducen los periodos de incubación extrínsecos (Takken y Knols, 2007). En consecuencia, es de esperar que se dé una redistribución geográfica de las enfermedades transmitidas por vectores y de las plagas de artrópodos en respuesta a la adaptación de estos organismos a las condiciones ambientales cambiantes (Patz y Olson, 2006). Los mosquitos son una pequeña parte del conjunto de todas esas especies introducidas, que acaban teniendo gran impacto sobre la salud pública y animal.

Actualmente, *Ae. albopictus* es una especie invasora que crea preocupación a nivel global debido a la facilidad con la que se ha dispersado y establecido en multitud de países con características ecológicas y climáticas muy dispares. En Europa, el Centro Europeo de Control de Enfermedades (ECDC), ante el riesgo creciente de aparición de brotes epidémicos de enfermedades transmitidas por vectores, creó un grupo de trabajo denominado VBORNET, que genera mapas actualizados de la distribución de las especies de mosquitos exóticos invasores a partir de datos compartidos por distintos grupos de investigación (<http://www.vbornet.eu>). La vigilancia orientada al control del mosquito tigre ha permitido con el tiempo detectar otras especies con gran capacidad vectorial como son *Ae. aegypti* en Madeira (Portugal) y en los Países bajos; *Ae. japonicus* en Francia, Bélgica, Alemania, Suiza, Austria, Eslovenia y Croacia, *Ae. koreicus* en Bélgica e Italia y *Ae. atropalpus* en Francia, Italia y los Países bajos (Medlock y cols., 2015).

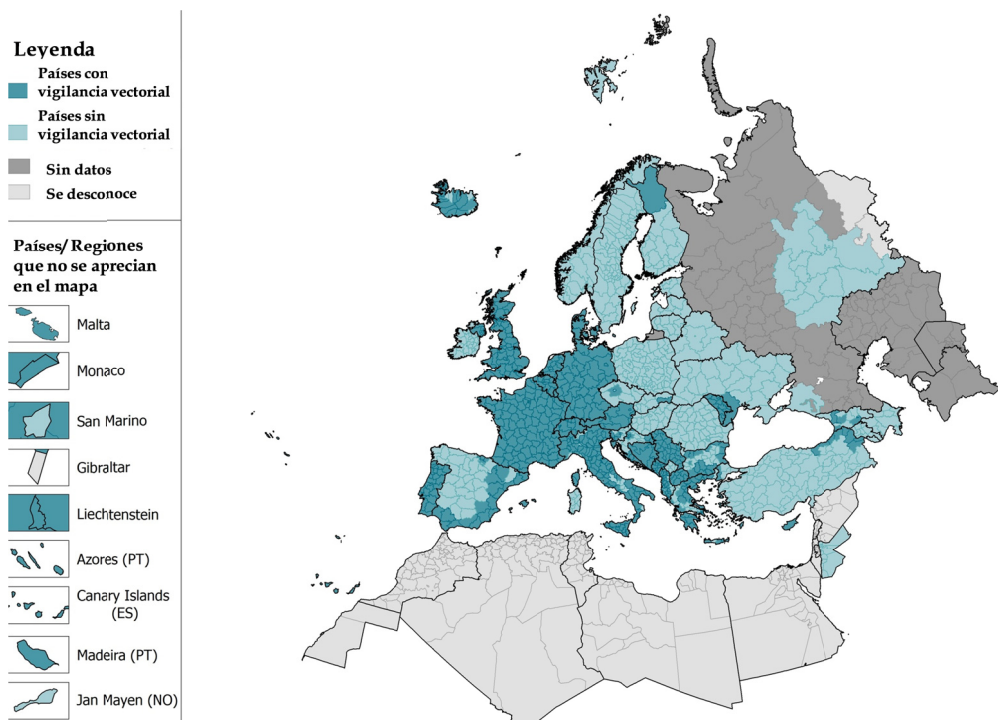
Hay que destacar que no todas las especies introducidas se establecen y dispersan rápidamente convirtiéndose en invasoras, es el caso de *Aedes triseriatus* (Say, 1823), *Toxorhynchites rutilus* (Coquillet, 1896) y *Orthopodomyia signifera* Coquillet, 1896, (Schaffner y cols., 2013), que fueron interceptadas y controladas con éxito. Afortunadamente, la adaptación de forma efectiva y rápida requiere de ciertas cualidades que posibilitan la invasión. En el proceso de invasión se pueden definir tres etapas básicas: introducción, establecimiento y expansión (Kolar y Lodge, 2001), aunque se pueden subdividir cada una de ellas en más etapas. Conocer las características específicas puede permitir las actuaciones asociadas a cada una de ellas: prevención (introducción), erradicación (establecimiento) y control o mitigación (expansión) (Grarock y cols., 2012).

Los mosquitos invasores del género *Aedes* son claros ejemplos de invasiones exitosas, principalmente mediadas por humanos, pero que han sido posibles gracias a varias características esenciales de las propias especies. Por una parte, la capacidad de los huevos a resistir la desecación, hecho que sin duda aumenta las posibilidades de realizar un transporte pasivo exitoso. Por otra parte, la capacidad de ocupación y explotación de ambientes antrópicos (Juliano y Lounibos, 2005). Asimismo, la superioridad en la competencia interespecífica, es una característica básica de una especie exótica que puede facilitar el que se convierta en invasora (Sakai y cols., 2001). Sin embargo, muchas especies no necesitan dicha característica para invadir un ecosistema, simplemente les basta con ocupar nichos vacíos (Juliano y Lounibos, 2005).

Por otro lado, las circunstancias ecológicas en el momento de la introducción pueden condicionar que la invasión acabe o no siendo un éxito. En este sentido, se le ha llegado a dar mucha importancia a lo que se conoce como presión del propágulo, entendida como el número de individuos liberados en una región en la que no son nativos. De modo que este factor es, en muchas ocasiones, el eje principal de las estrategias de prevención de las especies invasoras (Lockwood y cols., 2005). Esta presión suele tener lugar a escala local y regional pero viene a menudo derivada del comercio internacional y la globalización (Meyerson y Mooney, 2007).

La erradicación de algunas de estas especies es un objetivo poco realista, teniendo en cuenta lo establecidas que están en nuestro entorno más cercano. Se han adaptado a ambientes sinantrópicos en los que sacan provecho de la abundancia de lugares de reposo, de lugares de cría (sobre todo recipientes peridomésticos) y de gran variedad de hospedadores de los que alimentarse (ECDC, 2012). Por ello, los sistemas de control se limitan a reducir las molestas picaduras y el riesgo de transmisión de enfermedades (Schaffner y cols., 2013). Sin embargo, las tareas de vigilancia y de búsqueda de alternativas para su control deben seguir realizándose con el fin de limitar en lo posible la dispersión caótica de estas especies que, sin duda, tendría importantes consecuencias ambientales, económicas y epidemiológicas. Así mismo, serán necesarias para estimar la efectividad de las eventuales actuaciones de control que se acometan. El estado de las especies invasoras es un proceso dinámico que en un futuro tendrá mucho impacto en la epidemiología de las enfermedades de transmisión vectorial. La coordinación entre países es esencial considerando la envergadura de este problema que no entiende de fronteras. Además de la vigilancia entomológica, la mejora en la vigilancia epidemiológica posibilitará la detección precoz de casos (importados o autóctonos) y la implementación de medidas de control (Schaffner y cols., 2013).

Figura 8. Mapa de los países europeos en los que se realiza vigilancia de mosquitos exóticos. ECDC, 2017



3.4.1. Implicaciones sanitarias de los mosquitos invasores

Europa ha experimentado, en las últimas décadas, la introducción de varias enfermedades transmitidas por vectores (ETV) desde regiones tropicales y subtropicales, lo que ha hecho saltar las alarmas sanitarias y ha puesto en evidencia la necesidad de instaurar protocolos de prevención y respuesta frente a vectores de

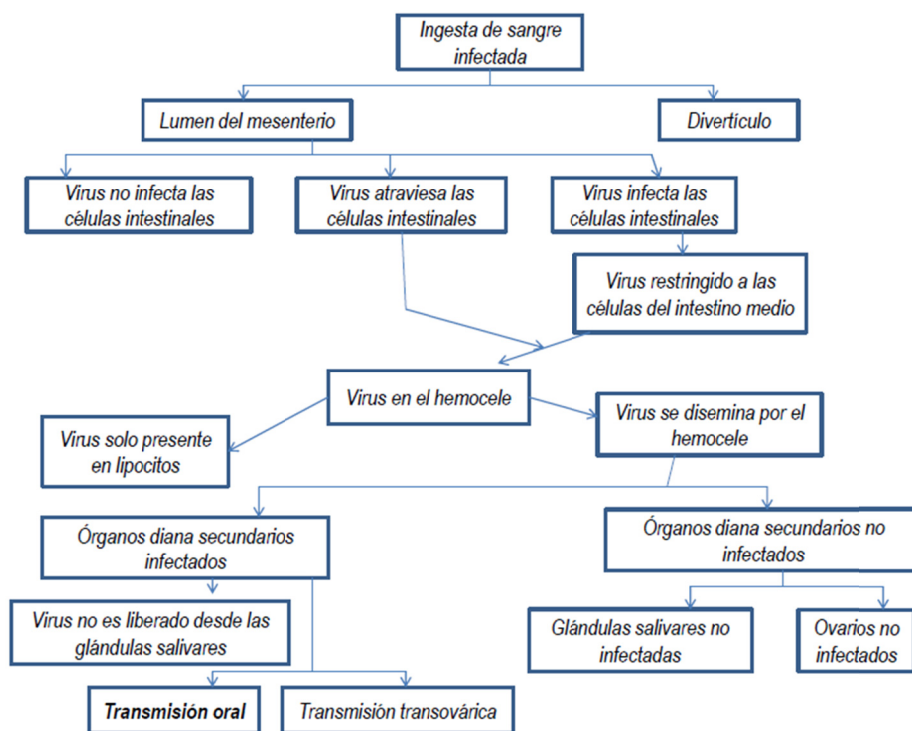
dichas enfermedades, con el fin de reducir en lo posible los costes de la aparición de brotes epidémicos (Canali y cols., 2017).

3.4.1.1. Enfermedad vectorial

Estas infecciones se definen como enfermedades en las que un agente patógeno (virus, bacteria, protista o animal parásito) es transmitido desde un hospedador infectado (hombre o animal) a otro a través de la picadura de un artrópodo hematófago competente (díptero, garrapata, piojo o pulga). El caso de las chinches americanas (Triatominos), es un caso excepcional. La infección no se produce directamente por la picadura sino que los protozoos salen con las heces, que pueden contaminar la herida de la picadura o mucosas por las que son capaces de penetrar en el vertebrado.

Para considerar a un artrópodo hematófago como vector competente de un patógeno, dicho patógeno debe ser capaz de superar las barreras que pueden impedir completar el ciclo infeccioso en el vector (Figura 9).

Figura 9. Ciclo infeccioso de un vector. Modificado de Mellor y cols., 2000



Después de que el patógeno ha sido ingerido con la sangre, mediante la picadura a un hospedador infectado, es capaz de penetrar en las células epiteliales del intestino medio del artrópodo donde se replica (Beerntsen y cols., 2000). El siguiente paso es hacia el hemocele. Hay evidencias de que algunos virus pueden pasar directamente del tubo digestivo al hemocele, entre las células epiteliales, lo que se denomina "intestino con goteras" (Nuttall y cols. 1991). A través de la hemolinfa llega a los distintos órganos. Si consigue infectar las glándulas salivares, el agente etiológico podrá ser liberado con la saliva durante la picadura a un nuevo hospedador y producirse la transmisión oral.

La replicación dentro del vector requiere de un periodo de tiempo conocido como periodo de incubación extrínseco, que depende del tipo de vector, de la cepa del patógeno así como de las condiciones ambientales que le confieren viabilidad al artrópodo (Zouache y cols., 2014).

3.4.1.2. Competencia y capacidad vectorial

Macdonald (1952) desarrolló una ecuación para calcular el ratio de reproducción (RR) de la malaria:

$$RR = \frac{m a^2 b P^n}{r (-\ln P)}$$

Donde: **m**: densidad del mosquitos respecto a la densidad de hospedadores; **a**: picaduras diarias por hombre; **b**: Competencia del vector; **P**: Probabilidad de supervivencia diaria del mosquito; **n**: duración del periodo de incubación extrínseco del patógenos, expresado en días; **r**: ratio de recuperación de casos de malaria por día.

Esta ecuación fue simplificada por Garrett-Jones (1964) al eliminar de la misma los términos **r** y **b**, por ser difíciles de calcular. La nueva ecuación resultante la define como la capacidad vectorial (C):

$$C = \frac{m a^2 P^n}{-\ln P}$$

En el XX congreso de la Society for Vector Ecology de 1988 (Reisen 1989a), se discutieron los distintos términos de la ecuación de Mcdonald y la reducción de Garret-Jones. Se mantuvo la eliminación del término **r**, referente a la recuperación de casos, y se reincorpora el término **b**, pero con una nueva definición y abreviatura: **V**, que es la competencia vectorial, la cual describe de forma cualitativa la eficiencia con la que es transmitido un patógeno adquirido por un vector:

$$C = \frac{m a^2 V P^n}{-\ln P}$$

Dye (1992) destaca que el término debe incluir que el parásito se desarrolla en el vector y vuelve a emplear el término **b** para la competencia vectorial. Entonces, la competencia vectorial está determinada por factores genéticos del propio insecto (Failloux y cols., 1999) y depende exclusivamente de la interacción vector-patógeno (Beaty y Marquardt, 1996), en lo referente a la posibilidad de infección, replicación dentro del vector, duración del periodo de incubación extrínseco¹ y la eficiencia de transmisión (en el sentido de producción de patógeno en glándulas salivares e inoculación del mismo).

-
- **Periodo de incubación extrínseco:** tiempo transcurrido desde que la hembra se alimenta con sangre infectada hasta que biológicamente es capaz de transmitir el patógeno.
 - **Periodo de incubación intrínseco:** tiempo transcurrido desde que el patógeno es inoculado en el vertebrado hasta que aparecen los primeros síntomas.

Sin embargo, la capacidad vectorial está afectada por factores intrínsecos y extrínsecos al vector (Garrett-Jones 1964, Meyer 1989, Reisen 1989b, Dye 1992). Los intrínsecos son variables dependiendo de las características concretas de las poblaciones del vector como la competencia vectorial, el tamaño poblacional, longevidad, duración y número de ciclos gonotróficos, preferencias tróficas y hábitos alimentarios. Entre los factores extrínsecos, unos afectan directamente a estos aspectos del vector como son la temperatura, humedad, la disponibilidad de hábitats propicios, etc. Por otro lado, la presencia, diversidad y abundancia de hospedadores afectan directamente a la capacidad vectorial en lo que se refiere a las proporciones entre vectores y hospedadores y el número de picaduras (términos m , a de la ecuación), duración de la viremia, periodo de incubación intrínseco, susceptibilidad a la infección del hospedador (Scott y Morrison, 2003), como indirectamente al ser un recurso trófico que afecta a las poblaciones de vector (Phasomkusolsil y cols., 2013). Los distintos procesos globales que están aconteciendo (aumento de las temperaturas, intensos intercambios comerciales, modificación del medio natural, entre otros,...) repercuten directamente sobre la distribución, fenología y abundancia de los vectores y, por tanto, sobre su capacidad vectorial.

3.4.1.3. *Aedes albopictus* como vector

Los mosquitos culícidos son el grupo de insectos más estudiado por su papel como vectores de enfermedades. Como hemos comentado anteriormente, las especies de mosquitos invasores son una amenaza potencial para la salud pública más que un problema medioambiental, aun cuando su control esté sujeto a una legislación medioambiental (Real Decreto 1628/2011).

La propia naturaleza de estos invasores incrementa el riesgo ya que son especies con gran adaptabilidad ecológica y con capacidad de cría en áreas urbanas, rurales y boscosas. Esto tiene importantes implicaciones para la salud pública puesto que la población humana tiene mayores probabilidades de entrar en contacto con zoonosis transmitidas por estos vectores. En este mismo sentido, suele ser competentes para la transmisión de múltiples patógenos por lo que son potenciales vectores puente a consecuencia de su comportamiento de alimentación oportunista (Cancrini y cols., 2003).

Con el paso del tiempo, dado que el problema de las invasiones no cesa e incluso se agrava, se han publicado una serie de revisiones acerca de la implicaciones de la presencia de mosquitos invasores en Europa (Gratz, 2004; Paupy y cols., 2009; Schaffner y cols., 2013; Medlock y cols., 2015) y en España (Bueno y Jiménez, 2012) y este hecho resalta la necesidad de conocer bien a las especies y su distribución con el fin de poner en marcha estrategias preventivas (ECDC, 2012).

La llegada de estas especies a un nuevo territorio representa un cambio sustancial del escenario epidemiológico de las enfermedades para las que son competentes.

Aedes albopictus no estaba considerado como buen transmisor de enfermedades víricas a humanos, a diferencia de *Ae. aegypti* que es el principal responsable de brotes

de enfermedades como dengue y fiebre amarilla en diversas partes del mundo (Paupy y cols., 2009). Sin embargo, el establecimiento en los últimos años de éstas y otras especies en Europa, ha aumentado la preocupación, particularmente en torno al riesgo de transmisiones autóctonas de arbovirosis emergentes (acrónimo derivado de *arthropod-borne virus*). Entre las más importantes cabría destacar el chikunguña, dengue y Zika (White y cols., 2016).

La capacidad del mosquito tigre para iniciar y mantener ciclos de transmisión de dengue es excepcional. Tras apenas siete días desde la ingestión del virus, ya es apto para diseminarlo (Rogers, 1993) y las hembras se mantienen infectivas durante toda su vida. Además, la posible transmisión transovárica o vertical del virus es una de las cuestiones que más dificulta el control de la enfermedad, puesto que la descendencia de esa hembra infectada también lo estará, ampliando drásticamente la dimensión epidemiológica de la enfermedad (Bueno y Jiménez, 2010). Respecto al virus chikunguña, en tan solo dos días, el virus llega a las glándulas salivares de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*, posibilitando así su transmisión a población susceptible. Esto pone de relieve la importancia de la pronta detección de casos, con el objetivo de realizar lo antes posible los controles entomológicos (Dubrulle y cols., 2009).

El virus Zika, no era considerado como peligroso hasta que originó un brote importante en 2007 en la isla de Yap (Duffy y cols., 2009). Años después, reemergió en la Polinesia francesa (2013-2014) y, en 2015, llegó a Brasil. Desde este país, se inició una epidemia hacia la región de las Américas, que desencadenó una emergencia sanitaria global declarada por la OMS en 2016. Este virus se transmite principalmente por *Ae. aegypti*. Sin embargo, se realizaron múltiples estudios que señalaron que *Ae. albopictus*, también es susceptible al virus, se replica, disemina y llega a las glándulas salivares (Chouin-Carneiro y cols., 2016; Di Luca y cols., 2016; Jupille y cols., 2016) sobre todo a temperaturas próximas a los 27°C (Heitman y cols., 2017), hasta que finalmente fue detectado en *Ae. albopictus* en México, en 2016 (PAHO 2016, Huerta y cols., 2017).

Tabla 1. Virus aislados en *Ae. albopictus* así como su competencia para la transmisión. ICTV, 2017

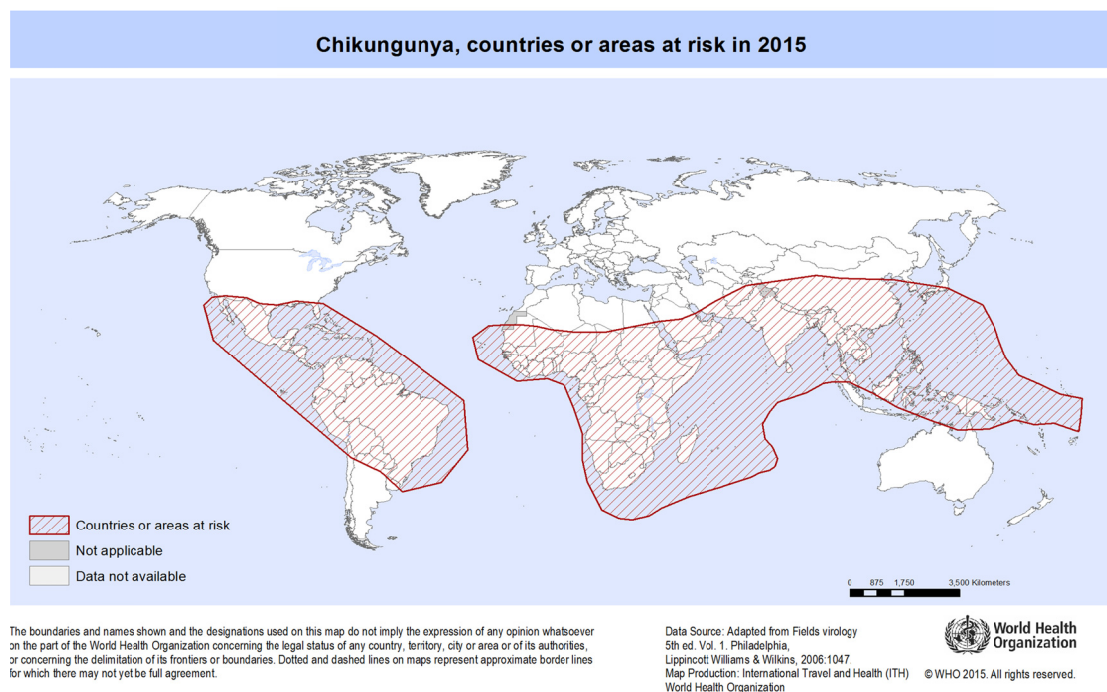
	Detección en campo	Transmisión en laboratorio	Competencia Vectorial
Orden Bunyvirales			
Phenuiviridae			
género <i>Phlebovirus</i> <i>Rift Valley fever phlebovirus</i> (RVFV)		X	
Peribunyaviridae			
género <i>Orthobunyavirus</i> <i>Bunyamwera orthobunyavirus</i> (aislados <i>Cache Valley virus</i> (CVV), <i>Potosi virus</i> (POTV), <i>Tensaw virus</i> (TENV))	X		X
<i>California encephalitis orthobunyavirus</i> (aislado <i>Jamestown Canyon virus</i> (JCV))			X
<i>La Crosse virus</i> (LACV)	X		X
<i>San Angelo virus</i> (SAV)			X
<i>Trivittatus virus</i> (TVTIV)			X
<i>Oropouche orthobunyavirus</i> (OROV)			X
Sin Orden asignado			
Flaviviridae			
género <i>Flavivirus</i> <i>Dengue virus</i> (DENV)	X	X	X
<i>Japanese encephalitis virus</i> (JEV)	X	X	
<i>Usutu virus</i>	X		
<i>West Nile virus</i> (WNV)	X	X	
<i>Yellow fever virus</i> (YFV)		X	
<i>Zika virus</i> (ZIKV/ZIKAV)	X		
Especie sin clasificar: <i>Aedes flavivirus</i> (AEFV)	X		
Togaviridae			
género <i>Alphavirus</i> <i>Chikungunya virus</i> (CHIKV)	X		
<i>Eastern equine encephalitis virus</i> (EEEV)	X		X
<i>Mayaro virus</i>			X
<i>Ross River virus</i> (RRV)			X
<i>Sindbis virus</i> (SINV)		X	
<i>Venezuelan equine encephalitis virus</i> (VEEV)	X		X
<i>Western equine encephalitis virus</i> (WEEV)			X

Paupy y cols. (2009) reportan además *Nodamura virus* (Familia Nodaviridae: Alphanodavirus; reportado como *Picornavirus*), pero esta especie de virus no es un arbovirus ya que causa la muerte del mosquito (Tesh 1980).

3.4.1.3.1. Transmisión autóctona en Europa

En el año 2007, se constató por primera vez que *Ae. albopictus* podía actuar en Europa como vector de enfermedades hasta la fecha consideradas tropicales. Concretamente, fue el responsable del primer brote autóctono del virus chikunguña que tuvo lugar en el norte de Italia, en Rávena, donde se detectaron más de 200 casos (Rezza y cols., 2007). La hipótesis más plausible atribuyó el origen a una persona procedente de India, país que sufrió una fuerte epidemia en 2006 con más de un millón de casos (Ravi, 2006). Los análisis filogenéticos así lo certificaron, puesto que la cepa viral aislada en Italia era muy similar a otras detectadas en el subcontinente indio (Yergolkar y cols., 2006). Ésta presentaba una mutación que la hace compatible con las poblaciones de mosquito tigre establecidas en Italia (Dubrulle y cols., 2009). En 2010, se registró el segundo caso autóctono de esta enfermedad (CHIKV) que tuvo lugar en Fréjus, sur de Francia (Gould y cols., 2010). Más recientemente, se ha producido una serie de brotes autóctonos en Italia con cerca de 300 casos repartidos en las regiones de Lazio, Calabria, Emilia-Romagna y Marche), con linajes de Pakistán e India. También Francia declaró un brote de 17 casos de chikunguña en el departamento de Var, al sur del país, pero en este caso los aislados son homólogos con linajes de las regiones centroafricanas (Gabón, República del Congo, etc) (ECDC, 2017).

Figura 10. Áreas de riesgo de transmisión de chikunguña. OMS, 2015

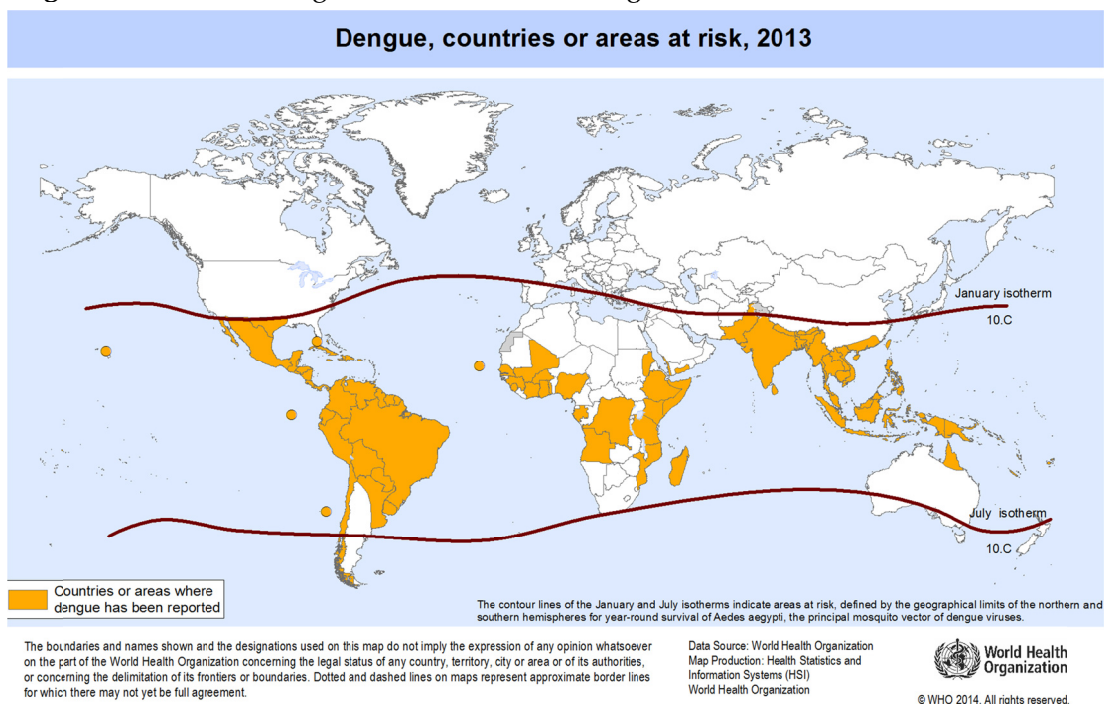


En 2010, la situación se tornó aún más preocupante cuando ese mismo año, se detectaron dos casos de dengue autóctono en Niza, Francia. Pese a que el primero de estos casos fue diagnosticado a partir de chequeos rutinarios, la detección del segundo

fue posible a través de la aplicación de un eficaz programa nacional de vigilancia epidemiológica. Consistió no sólo en la búsqueda activa de otros casos de dengue en personas que residiesen en los alrededores del primer paciente, sino también en el control antivectorial peridomiciliario de *Ae. albopictus*. (La Ruche y cols., 2010). Desde entonces, y gracias a la constante vigilancia que se lleva a cabo tanto de vectores como de casos importados, se han confirmado más casos de dengue en los últimos años (Cotteaux-Lautard y cols., 2013; Marchand y cols., 2013; Succo y cols., 2016). Escasas semanas más tarde, se comunicó un tercer caso autóctono de dengue, iniciado en Croacia aunque diagnosticado en Alemania (Gjenero-Margan, 2010).

De forma similar a lo acontecido en Francia, la rápida y eficaz investigación epidemiológica llevada a cabo por parte de las autoridades sanitarias croatas permitió detectar no solo el segundo caso autóctono de dengue en la misma zona sino también seroprevalencia frente al virus en otras 15 personas escasas semanas después (Schmidt-Chanasit y cols., 2010). Por lo tanto, estos casos han supuesto el retorno a Europa de ciclos de transmisión de dengue tras las últimas epidemias que acontecieron en Grecia entre 1927-1928 y que tuvieron como vector a *Ae. aegypti* (Halstead y cols., 1980). De hecho, en 2012, éste último fue el responsable de un importante brote de dengue autóctono (más de 2000 casos) en Madeira (Portugal) donde el vector lleva establecido desde 2005.

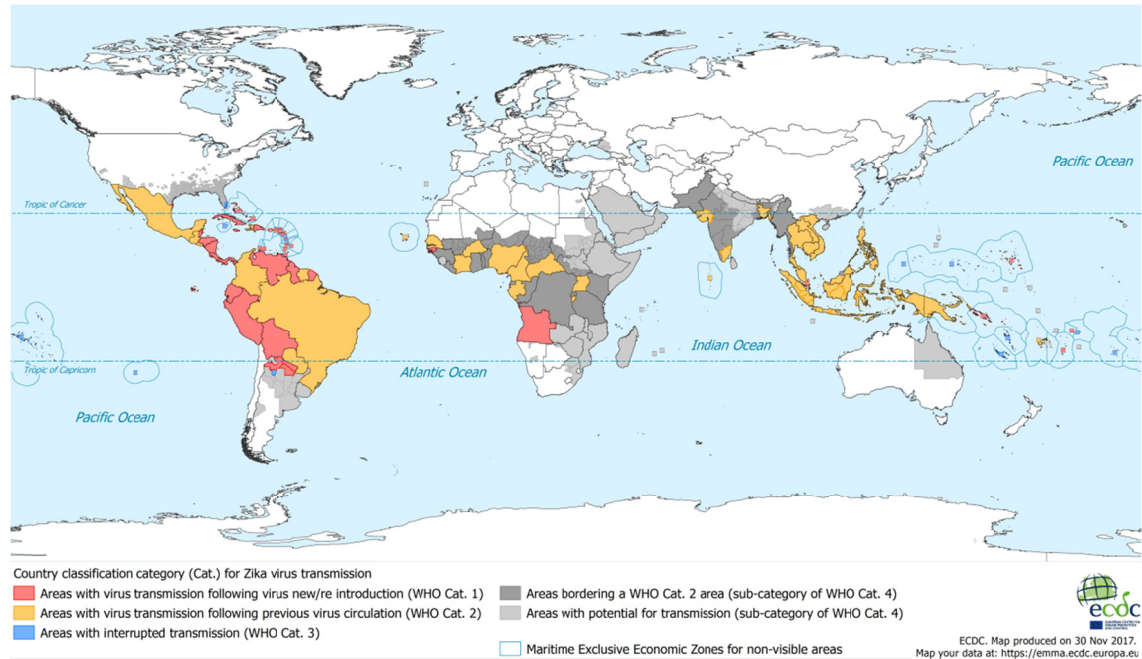
Figura 11. Áreas de riesgo de transmisión de dengue. OMS, 2014



En cuanto al ZIKV, hasta la fecha, en Europa solo se han registrado casos importados. Dado el intenso flujo de pasajeros provenientes de países con circulación activa del virus, y la creciente expansión de sus principales vectores, es realista pensar que existe un riesgo importante de aparición de brotes autóctonos. Rocklov y cols. (2016) incluyen una lista de países con alto riesgo de aparición de esta arbovirosis. El

máximo riesgo se produce en la época estival, cuando acontece el pico de viajeros desde las Américas coincidente con el máximo de capacidad vectorial. España aparece como uno de los países con riesgo importante de aparición de casos autóctonos de ZIKV, dado que existen importantes relaciones culturales, comerciales, turísticas y migratorias con Latinoamérica (Díaz-Menéndez y cols., 2016).

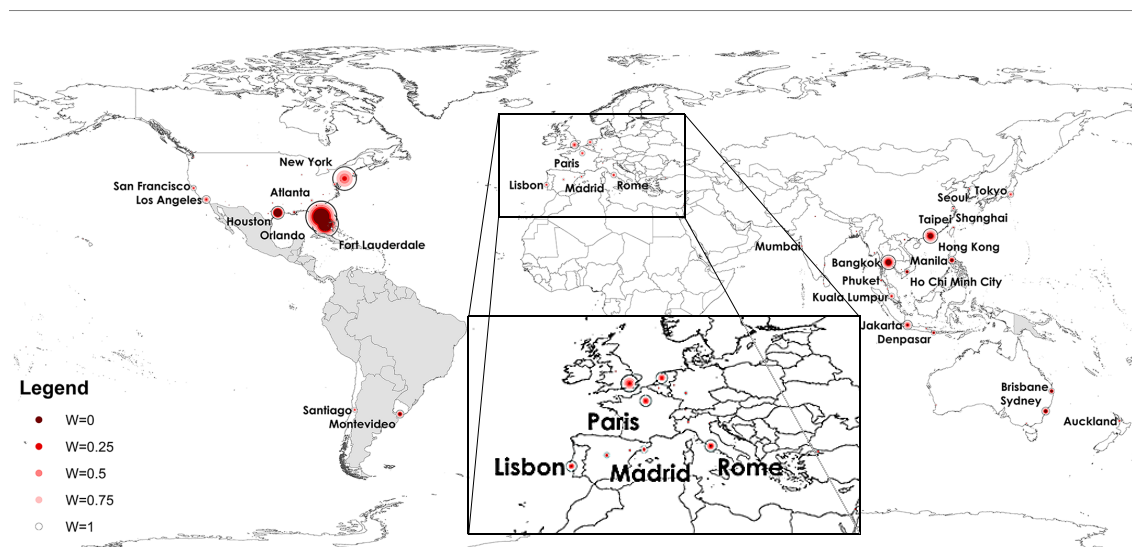
Figura 12. Clasificación de las áreas por transmisión de Zika. ECDC, 2017



La obtención de información acerca de la frecuencia y distribución en la población de las enfermedades transmisibles es precisa para poder controlarlas y constituye el objetivo principal de la vigilancia epidemiológica. En España, esta actividad está regulada por el R.D. 2210/1995 por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE). En 2013, se aprueba la actualización de los protocolos de las enfermedades de declaración obligatoria (EDO) de dicha Red, añadiéndose enfermedades cuya vigilancia es exigida por la Unión Europea y la Organización Mundial de la Salud (OMS); la Orden SSI/445/2015 modifica a su vez las relaciones de las EDO contempladas por el R.D. 2210/1995. Entre ellas se encuentran algunas enfermedades transmitidas por vectores (ETV) que las diferentes comunidades autónomas han ido incorporando a sus sistemas de vigilancia desde entonces. (Pagá y cols., 2015). En 2016, el Ministerio de Sanidad y Servicios Sociales e Igualdad aprobó un plan nacional de preparación y respuesta frente a los virus del dengue, chikunguña y zika (MSSSI, 2016).

En la ciudad de Barcelona se inició a partir de 2013 el primer programa piloto de España con el objetivo de implantar un sistema de vigilancia y control de las arbovirosis, a nivel humano y vectorial, para así lograr reducir el riesgo de transmisión de estas enfermedades de forma autóctona (González y cols., 2017).

Figura 13. Áreas de riesgo de transmisión de Zika. Modificado de Gardner y cols., 2017



3.5. Métodos de vigilancia y control

Las estrategias de control de mosquitos requieren la combinación de métodos de vigilancia entomológica con los de control. La vigilancia permite identificar espacial y temporalmente a las poblaciones a controlar, modula los métodos de control e informa de los resultados de dichas actuaciones.

3.5.1. Vigilancia entomológica

La vigilancia y monitorización de las poblaciones de mosquitos vectores de enfermedades son una parte importante de las estrategias de control, independientemente del riesgo inmediato de brote epidémico (AMCA, 2017). Existen diversos métodos mecánicos de trapeo cuyo objetivo principal es capturar adultos, que puede incluir el dificultar que su descendencia sea viable. La mayoría de los métodos disponibles para capturar mosquitos tienen como objetivo a las hembras grávidas (trampas de ovoposición, ovitrampas adhesivas, etc...) o hembras que buscan un huésped del que alimentarse (trampas de luz CDC, trampas EVS, BG-Sentinel (BGS)] (Biogents AG, Regensburg, Alemania). Las trampas BGS han demostrado ser muy efectivas para capturar *Aedes* sp. Especialmente si se ceban con CO₂ (Farajollahi y cols., 2009; Ferreira y cols., 2013; Roiz y cols., 2015). En Italia, este tipo de trampas empleadas junto al cebo *BG-lure* se evaluaron como herramienta de control de *Ae. albopictus*, demostrando una disminución notable de picaduras en un área determinada (Engbrecht y cols., 2015).

Las trampas de ovoposición, también denominadas ovitrampas, son recipientes empleados para atraer a hembras con intención de poner huevos ya que este grupo de aedinos tienden a ovipositar en pequeños envases, de preferencia oscuros. Las hay de distintos tipos, modificados a lo largo de los años con el fin de mejorar su rendimiento.

Suele emplearse este tipo de trampas debido a que son una herramienta de vigilancia pasiva muy sensible y barata que permite detectar actividad biológica, ambientes apropiados para la cría así como evaluar la dinámica de las poblaciones adultas de mosquitos (Dowling y cols., 2013). Si, además, se le añade algún producto larvicida, se asegura que, a largo plazo, el uso de la trampa sea igualmente útil sin el inconveniente de que ésta se convierta en una fuente de futuros adultos. En este sentido, existen varios tipos de ovitrampas denominadas autocidas (OA) que pueden incluir tiras de oviposición tratadas con insecticida (permetrina, deltametrina) (Zeichner y cols., 2011) o superficies adhesivas en las que quedan pegadas las hembras grávidas (Facchinelli y cols., 2007; Mendonca de Santos y cols., 2012; Eiras y cols., 2014). Varios estudios han verificado que la combinación de trampas de oviposición con efecto ovicida, junto a la reducción de lugares de cría y la aplicación de larvicidas reduce de forma significativa la presencia de *Ae. aegypti* y la transmisión del dengue (Barrera y cols. 2010, Lee y cols., 2013). Para que las ovitrampas sean más efectivas, se puede añadir algún tipo de infusión vegetal que sirva de atrayente orgánico. El desarrollo de estimulantes de la oviposición podrían mejorar la atracción hacia la trampa de las hembras grávidas haciéndolas más efectivas para el control del mosquito (Trexler y cols., 2003; Santana y cols., 2006).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el ECDC crearon el programa VectorNet, que es una red europea para compartir información sobre la distribución de artrópodos vectores que transmiten enfermedades humanas y animales. Este programa mantiene una información relativamente actualizada, ofreciendo una serie de mapas de distribución de los mismos (<https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors>). Así mismo ha elaborado diversos documentos sobre la vigilancia de mosquitos nativos (ECDC, 2014) e invasores (ECDC, 2012), y sobre el control de vectores con especial hincapié en *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (ECDC, 2017).

Como se ha señalado, desde 2016 existe un plan nacional para el control de las enfermedades vectoriales transmitidas por *Ae. albopictus* que incluye como fundamentales la vigilancia entomológica y el control de vectores para la prevención y control de las enfermedades vectoriales (MSSSI, 2016).

Recientemente, ha surgido una nueva disciplina denominada “ciencia ciudadana” que hace uso de las nuevas tecnologías para facilitar la cooperación popular. La aplicación de móvil “Mosquito Alert” es un ejemplo claro de ello, ha permitido detectar de forma precoz la presencia de *Ae. albopictus* en nuevas zonas de expansión. (Delacour y cols., 2014; Delacour y cols., 2016, Palmer y cols., 2017).

3.5.2. Control integrado

Frente al riesgo de transmisión de las citadas enfermedades vectoriales para las que no existe, en general, vacunas ni tratamientos específicos sino sintomáticos, la única opción de prevención es el control de los vectores (Shragai y cols. 2017).

Para un efectivo control, es necesario conocer bien al organismo diana y su relación con el entorno. En el caso de los aedinos invasores, su particular biología dificulta enormemente su control. Al igual que la especie cercana *Ae. aegypti*, el mosquito tigre se incluye en los denominados “mosquitos de contenedores”. Al encontrarse estos contenedores muy dispersos, el acceso a la multitud de lugares en los que son capaces de emplear como lugar de cría es, sin duda, una tarea ardua y complicada. Entonces, la habitual aplicación extensiva de insecticidas contra adultos o larvas no es efectiva (Paupy y cols. 2009).

Abramides y cols. (2013) demostró que el uso de múltiples estrategias de intervención (reducción de focos, tratamientos larvicidas y adulticidas y limpieza de vertederos incontrolados) es la clave para frenar la proliferación de *Ae. albopictus*. Además, concluyeron que la cooperación ciudadana era un componente esencial para implementar con éxito estas intervenciones.

El metaanálisis realizado por Bowman y cols. (2016) señala como el método más efectivo para controlar el dengue (por el control de vectores) a la combinación del uso de mosquiteras con las campañas de gestión ambiental (incluyendo principalmente la reducción o eliminación de potenciales focos larvarios).

Por tanto, el control integrado, definido como “*un proceso decisorio racional para la utilización óptima de los recursos para el control de vectores*”, en la que se incluyen enfoques multisectoriales para mejorar la salud humana (OMS, 2009), parece ser la solución más acertada para la gestión de *Aedes albopictus*. En la reciente revisión de ECDC (2017), todo el planteamiento de métodos de control de vectores se realiza desde la perspectiva del control integrado de vectores.

El equipo de la Dra. Dina M. Fonseca, de la Universidad de Rutgers (Nueva Jersey, EEUU), ha sido pionero en la promoción del manejo integrado del área para el control del mosquito tigre (Unlu y cols. 2011, Halasa y cols. 2012, Fonseca y cols. 2013, 2015, Crepeau y cols., 2013, Worobey y cols. 2013, Shepard y cols. 2014, Halasa y cols. 2014, Faraji y cols. 2014). En esta misma línea de trabajo, Unlu y cols. (2016) señalan que el control integrado contra los mosquitos de contenedores puede llegar a no ser efectivo porque implica una gran cantidad de recursos. Entonces, comprobaron que se puede aumentar la efectividad de las actuaciones al identificar *hot spots* (zonas de altas densidades) de *Ae. albopictus* y emplear los recursos para realizar un control más dirigido a esos lugares.

A continuación, se señalan los distintos tipos de control que se pueden combinar en el control integrado, como son el control ambiental, el uso reducido de sustancias químicas y el control biológico. Los métodos actualmente disponibles se resumen en la Figura 14.

3.5.2.1. Control ambiental

Como se ha señalado, las especies de mosquitos invasores encuentran multitud de lugares para criar en ambientes urbanos, suburbanos y rurales por lo que la gestión

ambiental es clave para el control de estos insectos. La eliminación de los potenciales lugares de cría es clave en el manejo y control del mosquito tigre ya que se evita tener poblaciones residuales. Por este motivo, la OMS (WHO 1997, 2006) recomienda la reducción/eliminación de los lugares de cría para el control de este tipo de mosquitos, dentro de las estrategias de control integrado de vectores para promover ambientes saludables (Lizzi y cols. 2014).

En este sentido, el documento de la OMS para el control del dengue (OMS & TDR, 2009) reconoce tres tipos de gestión ambiental, de las cuales las dos primeras van directamente orientadas a este fin:

Modificación ambiental: Cuando los hábitats son transformados de forma perdurable para reducir los lugares de cría. Puede incluir el cambio de infraestructuras.

Manipulación ambiental: Son cambios temporales, por lo tanto de continua aplicación, sobre los hábitats para reducir o evitar los criaderos; en general, actuaciones directamente sobre los contenedores como limpiezas, vaciados, etc. Cambios en las conductas de las personas o sus viviendas que reduzcan el contacto humano-vector.

El tercer tipo de gestión, toca más tangencialmente éste aspecto aunque la eliminación de lugares de cría en su entorno inmediato a las viviendas reducirá el contacto entre personas y vector.

En el caso del mosquito tigre, puede ser necesario el reformar algunas estructuras arquitectónicas que produzcan acúmulos de agua pero, en muchas ocasiones, los contenedores son más móviles y temporales.

Para conseguir el objetivo de reducir los lugares potenciales de cría, las campañas de educación y concienciación ciudadana han sido incluidas en numerosos programas internacionales de control de enfermedades vectoriales (Erlanger y cols., 2008, Esu y cols., 2010). Una estrategia que parece efectiva son las campañas de puerta a puerta, para informar a la ciudadanía del riesgo de acumular recipientes en las propiedades privadas y al tiempo que busque conseguir la concienciación y colaboración en las tareas de eliminación de potenciales lugares de cría (Richards y cols., 2008; Abramides y cols. 2013). Se ha demostrado que estas estrategias disminuyen, a largo plazo, los costes económicos del control (Grantham y cols., 2009, Shepard y cols. 2014). Debe haber un cambio cultural en el uso que se hace del agua, sobre todo de los métodos de almacenaje con el fin de evitar la proliferación y diseminación de mosquitos (Medlock y cols., 2012).

3.5.2.2. Control químico

3.5.2.2.1. Adulticidas

El empleo de insecticidas químicos por pulverización ha sido el método de control de mosquitos más empleado durante décadas. Sin embargo, estos productos tienen ciertas limitaciones de uso como la baja persistencia, la contaminación ambiental e, incluso, la elevada toxicidad para el ser humano y otros animales no objetivo (Erlanger

y cols., 2008; Bond y cols., 2012). Por estos motivos, la Agencia europea de los productos químicos (ECHA) ha legislado de forma estricta la aplicación de los insecticidas. Actualmente, en Europa, solo se permite emplear insecticidas reguladores de crecimiento (IGR: *Insect growth regulators*) y piretroides como métodos de control de larvas y adultos respectivamente.

El control de mosquitos mediante la pulverización aérea y terrestre se considera uno de los métodos más comunes pero menos racionales (Bonds 2012). En Europa, el primero de ellos solo se realiza en casos muy concretos de emergencia sanitaria (Bellini y cols., 2014). Los mosquitos adultos son fácilmente controlados mediante insecticidas aplicados a muy bajas dosis, pero suponen un elevado coste con baja eficacia a largo plazo.

Los tratamientos a ultra bajo volumen (ULV: *Ultra Low Volume*) consisten en la aplicación del mínimo volumen efectivo del producto formulado (Mount, 1998). También se suelen denominar tratamientos de humo frío, en comparación con tratamientos mediante termonebulización, que dispersan el insecticida mediante calentamiento. Esta metodología está recomendada por la OMS para combatir culícidos, aunque que tendría que ser mejor estudiada para el control de *Ae. aegypti* y de *Ae. albopictus*, ya que no alcanza la totalidad de los lugares de descanso de estas especies (Esu y cols., 2010). Generan una nube de microgotas (de aproximadamente 20 µm de diámetro) de insecticida que tienen como objetivo impactar sobre los mosquitos que estén volando, causando una mortalidad denominada “de choque o primaria”. El resto de gotas de insecticida acabarán cayendo sobre el suelo o la vegetación donde podrán producir una mortalidad secundaria, aunque se considera como residual y no es el objetivo de los tratamientos ULV. Este tipo de procedimientos ha de repetirse de forma secuencial con el fin de eliminar los insectos adultos que sigan emergiendo y, por tanto, el uso exclusivo de este método de control como base de un programa es irracional e inviable (Bonds 2012).

Algunos trabajos de pulverización con cipermetrina (Abramides y cols., 2013), deltametrina (Bengoa y cols., 2014) y permetrina (Caputo y cols., 2015) han mostrado una reducción importante de la abundancia de adultos y una buena residualidad de las formulaciones en la vegetación. Sin embargo, el uso sistemático indiscriminado de los adulticidas, con métodos de aplicación mal ejecutados y uso por parte del público en general, puede promover poblaciones resistentes (Manica y cols., 2016). En el caso del control de vectores de enfermedades, el verdadero problema de la pérdida de efectividad es que se dispondrían de menos, o ninguna, herramientas de control de los adultos cuando más necesarios y urgentes son: en el caso de aparición de un brote epidémico.

Cada vez existe más información acerca de resistencia a los insecticidas por parte de *Ae. albopictus*. Vontas y cols. (2012) resumen las experiencias descritas sobre este tema a nivel global. En España, un estudio reciente de resistencias a insecticidas, llevado a cabo sobre poblaciones de *Ae. albopictus* españolas, ha mostrado indicios de aparición

de resistencias a ciertos piretroides frecuentemente empleadas como cipermetrina, deltametrina y permetrina (Bengoa y cols., 2017).

En este sentido, la OMS (2006) recomienda hacer un uso responsable de los biocidas restringiendo así la aplicación de tratamientos adulticidas en casos de alto riesgo epidémico y de altas densidades poblaciones puntuales. Estos eventos pueden suponer un problema para la salud humana así como favorecer la rápida evolución epidemiológica de un caso virémico compatible importado (Farajollahi y cols., 2012; Lee y cols., 2014)

Otros recursos son los cebos tóxicos atrayentes a base de azúcares (ATBS: *attractive toxic sugar baits*). Llevan años siendo estudiados ya que tanto machos como hembras precisan de sustancias naturales azucaradas (néctar) como alimento. Así pues, los ATBS son soluciones azucaradas y con zumo de frutas a los que se añade alguna sustancia tóxica (ácido bórico o eugenol, etc...) o algún insecticida (por ejemplo dinotefuran o fipronil, etc...) (Fiorenzano y cols., 2017). Pueden ser empleados en puntos concretos cercanos a lugares de cría. La pulverización sobre la vegetación es la técnica que mejores resultados da en el control de *Ae. albopictus*. Además, esta técnica no tiene apenas impacto sobre la fauna no diana, sobre todo, si la aplicación se realiza sobre vegetación que no florece (Revay y cols., 2014).

Entonces, la aplicación de adulticidas solo se recomienda, de modo excepcional, para altas abundancias frente a alertas epidemiológicas, ya que la corta duración del ciclo del insecto, la gran producción de descendientes y la diseminación de lugares de cría incontrolados obligaría a aplicaciones muy frecuentes y continuas, lo que no resultaría rentable ni económicamente ni ambientalmente.

3.5.2.2.2. Tratamientos larvicidas

Se suelen emplear larvicidas en estructuras del área pública. En las áreas privadas, numerosos objetos contenedores de agua actúan como lugares de cría incontrolados por lo que será imprescindible combinar su uso con el control ambiental.

Los tratamientos químicos con IGRs en aguas permanentes como medio de control larvario son muy efectivos en el tiempo y se reduce de forma considerable las poblaciones (Poletti y cols. 2011). Los juvenoides, como el piriproxifeno y el metopreno, son agonistas (sustancias análogas) de la hormona juvenil. Su acción impide la pupación y, por tanto, el paso del estadio inmaduro a adulto. En cambio, los inhibidores de la hormona juvenil (precocenos) producen adultos prematuros que no suelen ser viables (Cupp y cols., 1977). Los inhibidores de ecdisona provocan la muerte de la pupas. Algunos inhibidores de síntesis de quitina, como el diflubenzurón, triflumuron o novaluron, inhiben la formación de la cutícula del insecto (OMS 2006, Dhadialla y cols. 2009). Su empleo es mucho más efectivo si se emplea directamente en los focos de cría.

En algunos trabajos se ha incorporado el uso de piriproxifeno a los programas de control de mosquito tigre (OMS 2009). Los efectos nocivos de este producto sobre otros

organismos beneficiosos se minimizan debido a que los focos larvarios no coinciden. También presentan propiedades ovicidas, por lo que, dependiendo de las dosis aplicadas, evitan la eclosión de los huevos de algunas especies o provocan una salida anómala de la diapausa, y la muerte (Suman y cols., 2013, 2015). En Italia, las estrategias de control se centran en tratamientos de sumideros con IGR observándose menor emergencia de adultos y mayor persistencia contra *Ae. albopictus* con el uso de diflubenzurón que con piriproxifen (Bellini y cols., 2009).

Debido a la dificultad de acceso a la gran cantidad de lugares potenciales de cría de aedinos, se está investigando la capacidad de las hembras para autodiseminar los compuestos (piriproxifeno) (Devine y cols., 2009; Snetselaar y cols., 2014; Abad-Franch y cols., 2017, Unlu y cols., 2017, Buckner y cols. 2017). Las hembras de mosquitos pueden contaminarse con el insecticida a través de una red impregnada o una ovitrampa modificada. También se han obtenido buenos resultados empleando las trampas BG como atrayentes y estaciones de diseminación (Pires y cols., 2016). Esta metodología induce una alta mortalidad de larvas en *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en Perú e Italia (Devine y cols., 2009; Caputo y cols., 2012; Abad Franch y cols., 2017). Además, se han observado efectos en la producción de huevos así como en la eclosión de éstos (Ohba y cols., 2013). Esta nueva línea de investigación podría ser una herramienta muy útil en el control del mosquitos del género *Aedes*.

3.5.2.3. Control biológico

3.5.2.3.1. Aceites esenciales de origen vegetal

Tras el descubrimiento de las propiedades terapéuticas de la artemisina para combatir la malaria (Klayman, 1985), muchos estudios han revelado la importancia que podrían jugar los derivados de plantas y hongos para el control de parásitos y mosquitos. De hecho, algunas moléculas de origen vegetal interfieren en el patrón de alimentación de insectos, actúan como inhibidores del crecimiento e, incluso, pueden ser neurotóxicos (Baldacchino y cols., 2015). Los aceites esenciales se usan comúnmente como repelentes pero se ha observado que podrían emplearse como larvicidas, como indica el trabajo de Días y Moraes, (2014). Estos autores testaron la actividad larvicida contra *Ae. aegypti* de más de 360 aceites esenciales derivados de 269 especies de plantas. Una de ellas, *Azadirachta indica* A. Juss., de la que se obtiene el aceite de neem, resulta ser también efectiva contra *Ae. albopictus* y *Ae. japonicus* (Mikami y Yamashita., 2004; Maheswaran y Ignacimuthu., 2012). La producción de estos aceites es más barato que los compuestos de síntesis o aislados de forma individual. Además, al obtenerse de una fuente renovable suele tener buena aceptación (Dias y Moraes., 2014). No obstante, se desconoce el verdadero impacto medioambiental por lo que, antes de ser comercializados como larvicidas, se debería realizar más bioensayos (Benelli, 2015). Un ejemplo es el trabajo de Escartin y Mariani (2014) en el que ponen de relieve la toxicidad para peces y larvas de anfibios del aceite del eucalipto limón (*Corymbia citriodora* (Hook.))

3.5.2.3.2. Depredadores

Una de las bases más antiguas del control biológico ha consistido en la introducción de depredadores naturales en los lugares de cría de los mosquitos. Algunos organismos como los peces, los anfibios, las larvas de odonatos, los copépodos e incluso las larvas de otros mosquitos son depredadores naturales de larvas y pupas de culícidos (Kumar y Hwang., 2006). Dado los particulares lugares de cría del mosquito tigre, el uso de muchos de estos predadores se presenta como poco práctico. Los peces larvívoros, como los pertenecientes a la familia Cyprinodontiformes, especialmente especies del género *Gambusia* Poey, 1854, han sido los más ampliamente estudiados y se ha demostrado su eficacia en multitud de ambientes (Chandra y cols., 2008; Griffin y Knight., 2012), aunque se ha observado que su presencia en el agua induce una cierta inhibición de la oviposición a *Ae. albopictus* (Zuharah y cols., 2016).

Los copépodos ciclopoideos de ciertos géneros dulceacuícolas (*Macrocyclus* Claus, 1893, *Mesocyclops* Sars G.O., 1914, *Acanthocyclops* Kiefer, 1927) se han utilizado con éxito como control biológico de las larvas de mosquitos (Marten y Reid., 2007). Este método ha sido especialmente útil en regiones donde hay enfermedades transmitidas por mosquitos. Por ejemplo, en Vietnam se consiguió reducir el dengue con una campaña de inoculación de especies de ciclopoideos autóctonas en los depósitos de agua de las casas, para el control de larvas de *Ae. aegypti* (Kay y Nam, 2005; Vu y cols., 2012). En Florida, la población de *Mesocyclops longisetus* (Thiébaud, 1912) aumentó en los dos o tres meses, después de ser introducidos en contenedores de áreas urbanas/suburbanas, controlando a largo plazo las poblaciones de mosquitos en la zona (Soumare y Cilek, 2011). Sin embargo, los copépodos solo se alimentan de los primeros estadios larvarios por lo que, tras ese periodo de crecimiento poblacional, el control de culícidos por los copépodos no es total. Por ello, la combinación con toxinas bacterianas (véase más adelante), inocuas para los copépodos, puede ser una opción muy útil para combatir los estadios larvarios más avanzados. No se conoce mucho acerca de la capacidad predadora de muchas de las especies de copépodos europeos, a excepción del trabajo de Veronesi y cols., (2015) que presentaron resultados positivos del control de *Ae. albopictus* en Italia con *Macrocyclus albidus* (Jurine, 1820).

3.5.2.3.3. Bacterias y hongos entomopatógenos

De forma natural, existen algunos organismos que resultan patogénicos para los mosquitos y que también pueden ser considerados como estrategias de control biológico.

Bacillus thuringiensis Berliner, 1915, serotipo *israelensis* (Bti) se emplea frecuentemente para el control de mosquitos. Se trata de una bacteria gram-positiva que, durante el proceso de esporulación, produce una serie de proteínas altamente tóxicas para las larvas acuáticas de culícidos y simúlidos, al ser ingeridas (Lacey, 2007). La aplicación continuada de Bti podría desencadenar la aparición de resistencia a la toxina como se describió para *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Georghiou y cols., 1997). Para evitar este tipo de problemas, puede combinarse Bti con *Lysinibacillus sphaericus* (Neide, 1904) (Lsph) (Guidi y cols., 2013; Boyce y cols., 2013). Esta especie anteriormente era conocida como *Bacillus sphaericus* (Ahmed y cols., 2007). Esta especie

también puede emplearse sola, puesto que posee propiedades parecidas al Bti pero con persistencia de varias semanas. Se ha probado su eficacia frente a varias especies de mosquitos invasores, incluido *Ae. albopictus* (Anderson y cols., 2011; Eritja, 2013).

Por otro lado, se conocen varios géneros de hongos entomopatógenos que producen esporas infectivas (conidios) que se adhieren y penetran en la cutícula del insecto, liberando toxinas que terminan por matarlo (Scholte y cols., 2004). La mayoría de trabajos han demostrado el efecto patogénico de *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin sobre los principales vectores de malaria (Knols y cols., 2010; Blanford y cols., 2005) así como sobre *Ae. aegypti* (Paula y cols., 2011) y, más recientemente, sobre *Ae. albopictus* (Lee y cols., 2015). Son una alternativa prometedora como método de control de mosquitos (Darbro y cols. 2012) ya que la EPA (Agencia de Protección Ambiental Americana) ha señalado que no existe riesgo de intoxicación humana por el uso de *M. anisopliae* ni efecto nocivo sobre otra entomofauna beneficiosa (EPA, 2009). En estas dos especies de *Aedes*, se ha observado tanto efecto larvicida como adulticida por parte de *M. anisopliae* (Scholte, 2007). La actividad ovicida ha sido señalada por Sousa y cols. (2013), sobre huevos de *Ae. aegypti*.

El potencial entomopatógeno de *B. bassiana* se ha empleado en una trampa de diseminación de piriproxifeno (larvicida) para producir la posterior muerte de la hembra diseminadora (Snetselaar y cols., 2014).

3.5.2.4. Liberación de mosquitos modificados y selección de machos

A continuación, se presentan una serie de nuevas técnicas de control biológico todavía en fase de desarrollo que se basan en modificar de alguna manera los ejemplares de mosquitos. Éstos, serán liberados para producir efectos de control en las poblaciones de mosquitos intervenidas.

La mayoría de estas líneas de investigación actúa sobre los machos, pero como la separación por sexos se hace en el estadio de pupa, existe un cierto riesgo de liberación de hembras fértiles. Machos y hembras difieren en el tamaño del cefalotórax pupal, siendo más grandes las hembras, por lo que se emplean tamices de tamaño de poro calibrados (Bellini y cols., 2007; Mikery-Pacheco y cols., 2015). Pero este tamaño corporal se conserva siempre que se mantengan estables diversas condiciones durante la cría como la temperatura, la densidad poblacional, la dieta, etc..., ya que como se ha indicado anteriormente, pueden afectar al tamaño de los individuos. Aún así, se produce un error del 5% o más (Bellini y cols., 2007; Mikery-Pacheco y cols., 2015), que parece insignificante pero, al liberar decenas de miles de individuos, podría contribuir al aumento de la población de mosquitos cerca del área de suelta.

Por otro lado, parte de los machos resultan dañados, lo cual hace que la producción pierda eficiencia (Bellini y cols., 2007). Para evitar esto, se irradian las pupas con una dosis lo suficientemente potente como para repercutir negativamente sobre la fecundidad y fertilidad de las hembras pero que no afecte al potencial reproductor de los machos (Zhang y cols., 2015). Desde el punto de vista de la epidemiología de

picaduras, este método seguiría siendo inadecuado, ya que aumentaría, al menos al principio, el número de individuos picadores en las áreas de suelta.

La más reciente aproximación al problema trata de manipular el factor que determina la masculinidad (*male determining factor*) en *Ae. aegypti* (Hall y cols., 2015; Adelman y Tu., 2016) de modo que se produzca una conversión de las hembras en macho o produzca la muerte de las hembras.

3.5.2.4.1. La técnica del insecto incompatible (TII)

La TII está basada en el efecto que tiene la bacteria endosimbionte *Wolbachia pipientis* Hertig, 1936 sobre algunas especies de insectos. Está presente de forma natural en otros artrópodos y en nematodos. En el caso de los mosquitos, su presencia induce un fenotipo con una característica reproductiva conocida como incompatibilidad citoplasmática (IC). Ésta se traduce en una inviabilidad de la descendencia cuando un macho infectado copula con una hembra no infectada (IC unidireccional) o infectada por otra cepa de *Wolbachia* (IC bidireccional). Sin embargo, cuando las hembras están infectadas sí que pueden dar descendencia viable tanto con machos infectados como con no infectados. En estos casos, la bacteria se transmite de una generación a la siguiente manteniéndose así de forma natural la infección dentro de la población (Atyame y cols., 2016).

Esta es una línea de investigación prometedora y se está trabajando en nuevas cepas con múltiples infecciones (Zhang y cols., 2015). La infección natural por *Wolbachia* está descrita en algunas especies de mosquitos vectores de enfermedades como *Culex pipiens* y *Ae. albopictus* (McGraw y O'Neill, 2013) pero no en *Ae. aegypti*, aunque se han conseguido machos infectados que no presentan problemas de viabilidad (McMeniman y cols., 2009).

El uso de esta alternativa se torna aún más interesante puesto que se ha observado que la infección de *Wolbachia* puede prevenir la transmisión de arbovirosis como el dengue, chikunguña, fiebre amarilla, encefalitis japonesa, zika y algunas filarias (Moreira y cols., 2009; Mousson y cols., 2012; Hoffman y cols., 2015) y más recientemente en *Ae. aegypti* del virus zika (Dutra y cols., 2016). El proyecto “*eliminate dengue*” lidera las investigaciones que apoyan esta técnica para el futuro del control de enfermedades (<http://www.eliminatedengue.com>).

En Estados Unidos se ha aprobado recientemente el uso de esta técnica para liberar machos infectados en 20 estados y en paralelo se está desarrollando la técnica en China (Waltz, 2017).

3.5.2.4.2. La técnica del insecto estéril (TIE)

La TIE es un método de lucha biológica consistente en la cría masiva y suelta de machos de insectos previamente esterilizados mediante irradiación o con agentes químicos. La esterilización se produce tras generarse aberraciones cromosómicas y mutaciones letales dominantes en el esperma. Al copular con hembras silvestres, dan lugar a la puesta de huevos inviables, evitando así su descendencia.

Esta técnica ha demostrado su éxito en el control de diferentes especies como el gusano barrenador del ganado *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) en los Estados Unidos, México y América central, así como Libia, la mosca tsetse *Glossina austeni* (Newstead, 1912) en Zanzíbar (Vreysen y cols., 2014) y la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) en numerosos países (Alphey y cols., 2010). En términos de control de mosquitos, el uso de esta técnica eliminó con éxito a *Culex quinquefasciatus* en una isla de Florida y *Anopheles albimanus* Wiedemann, 1820 en El Salvador (Patterson y cols., 1970).

Sin embargo, es esencial que para que la TIE sea eficaz debe haber una supervivencia y capacidad de cópula similar entre los machos estériles y los machos silvestres (Oliva y cols., 2012). Para ello se han propuesto métodos de control de calidad de la producción (Balestrino y cols., 2017).

El Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA por sus siglas en inglés) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) promueven el uso de la TIE, dando soporte para investigar y solucionar los problemas que conllevan su aplicación (Lees y cols., 2015).

A pesar de las dificultades, algunos estudios preliminares llevados a cabo en Italia señalan que esta estrategia puede ser de gran utilidad para el control de *Ae. albopictus* (Bellini y cols., 2013). En España, la Consejería de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural de la Comunidad Valenciana y la empresa TRAGSA, como participantes del proyecto internacional "*Mosquito Handling, Transport, Release and Male Trapping Methods*", están realizando ensayos y actividades preparatorias para un proyecto piloto de lucha contra esa misma especie, que se desarrollará a lo largo de 2017 y 2018 (TRAGSA, 2017). Algunos autores también apuestan por la combinación de insectos estériles con otras técnicas como la infección con *Wolbachia* (Zhang y cols., 2015), la autodiseminación de inhibidores del crecimiento (Bouyer y Lefrançois, 2014) e, incluso, la diseminación de densovirus en las poblaciones silvestres con el fin de producir la muerte masiva de larvas descendientes (Bouyer y cols., 2016).

3.5.2.4.3. Mosquitos genéticamente modificados

Por último, existe otro método, la modificación genética de mosquitos. Unas van encaminadas al control de los mosquitos pero otras se centran en disminuir la transmisión de las enfermedades vectoriales. Existen tres líneas principales de investigación.

En primer lugar, La más conocida es la liberación de machos portadores de un gen dominante letal. La letalidad de tal gen se inhibe en presencia de tetraciclina, lo que permite su cría. En libertad, al no disponer de una fuente de tetraciclina, los individuos mueren en fase larvaria (Phuc y cols., 2007). Los machos genéticamente modificados transmiten el gen letal cuando copulan con hembras silvestres, que originarán una descendencia que morirá en estadio larvario. Las cepas transgénicas de estos mosquitos son propiedad de la empresa Oxitec (Oxitec Ltd, Abingdon, UK). La

experiencia llevada a cabo en las Islas Caimán demostró que la cepa OX513A de *Ae. aegypti* compite eficazmente con machos salvajes y llegó a reducir un 80% la población local de la especie (Harris y cols., 2012). En Brasil, se realizaron experiencias en la ciudad de Juazeiro (Bahia), llegando a reducir un 95% la población local de *Ae. aegypti* (Carvalho y cols., 2015). A pesar de los resultados prometedores, todavía existe mucha controversia acerca de la utilización de estas técnicas para el control de vectores que transmiten enfermedades ya que se desconoce, en muchos casos, el impacto que podría tener en las poblaciones silvestres debido a que la tetraciclina puede estar presente en el agua, inactivando así la modificación genética de los machos (Bouyer y cols., 2016). También se ha trabajado con hembras de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* portadoras de un gen letal dominante que las incapacita para volar, picar y copular (Labbé y cols., 2012).

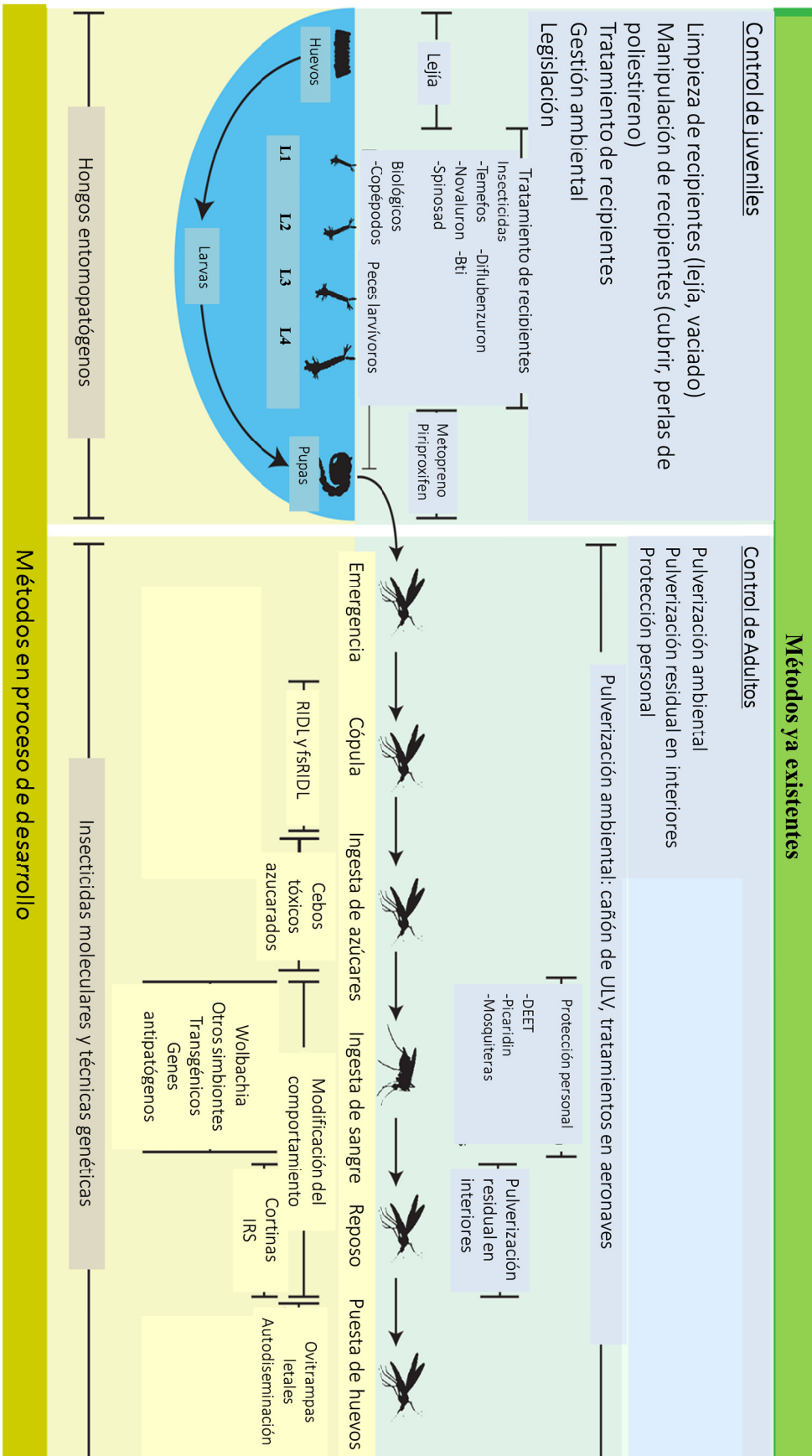
En segundo lugar, existe el método del RNAi (*RNA interference*) que pretende mejorar la respuesta inmune del insecto reconociendo y degradando los virus de RNA invasores. En *Ae. aegypti*, por el momento, se ha trabajado en genes resistentes al virus dengue tipo 2 (Franz y cols., 2006; Blair y Olson, 2015).

Por último, algunos investigadores trabajan en genes HEGs que codifican enzimas endonucleasas, que reconocen y cortan regiones específicas del ADN. Los HEGs pueden programarse para alterar genes relacionados con la competencia vectorial, la fertilidad o la determinación de sexos, seleccionando así una población con hembras resistentes a patógenos o disminuyendo progresivamente las densidades poblacionales. Hasta la fecha, se han modificado ejemplares de *Ae. aegypti* (Traver y cols., 2009) y *An. gambiae* (Windbichler y cols., 2011).

Estas técnicas tienen todavía que demostrar su potencial como métodos de control en campo, en condiciones naturales donde pueden enfrentarse a multitud de parámetros que inactiven los efectos de las cepas transgénicas.

Brown y cols. (2014) proponen lugares donde realizar de segura los ensayos en campo con mosquitos genéticamente modificados. Deben hacerse de forma segura y respetuosa con el medio ambiente y la OMS proporciona una guía de buenas prácticas para los ensayos con mosquitos genéticamente modificados (OMS, 2014). El Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica de 1999 (<http://bch.cbd.int/protocol/default.shtml>) se debe aplicar sobre la producción de mosquitos genéticamente modificados (Marshall, 2010). Dentro del marco del Convenio de sobre la Diversidad Biológica (<https://www.cbd.int>), en 2010, se creó un grupo de trabajo *ex profeso* de evaluación y manejo de riesgos de mosquitos genéticamente modificados (https://bch.cbd.int/onlineconferences/mosquitoes_ahteg_ra.shtml) que generó una directriz al respecto. En 2015, se celebró un congreso sobre las nuevas aproximación del manejo de vectores (*Translational Considerations of Novel Vector Management Approaches*) (Costero-Saint Denis y cols., 2016) que concluyó en diversos aspectos sobre la necesidad de regulación y control de estas metodologías.

Figura 14. Métodos ya existentes y en desarrollo de control de mosquitos. Modificado de Achee y cols., 2015



3.6. Estudios genéticos

Inicialmente, el estudio de la genética de *Ae. albopictus* estaba destinado al mejor conocimiento de su cariograma. Los trabajos estaban enfocados a entender la estructura genética y cómo ésta definía el sexo y el fenotipo de la especie. Así, Rai (1963) describió que *Ae. albopictus* posee tres pares de cromosomas metacéntricos con un contenido de DNA haploide variable. El avance en las técnicas de trabajo molecular con marcadores de tipo enzimático permitió, en los años 80 del siglo XX, describir mutaciones y crear ciertas agrupaciones morfológicas de la especie (Tadano, 1984, 1987; Yong y cols., 1981). Más tarde, se trabajó analizando la variación de alozimas con muestras americanas lo que permitió describir las primeras observaciones de diferenciación genética a nivel local de las poblaciones de mosquito tigre (Black y cols., 1988a, b). Los estudios genéticos se centraron, entonces, en tratar de relacionar las poblaciones de mosquito tigre invasoras con el origen de éstas. Calcularon que alrededor de un 75% de la variación en las frecuencias alozimáticas de las poblaciones americanas eran debidas a diferencias existentes en cada punto de muestreo de una misma ciudad. Esto podría ser atribuible a la reciente colonización ocurrida en el país, con numerosos pequeños procesos fundadores en cada ciudad. Este hecho se pudo corroborar poco después con muestras de Malasia en las que también se observaba un patrón similar con una fuerte diferenciación local con una relativa poca variación genética entre regiones geográficas (Black y cols., 1988b). Estos marcadores mostraron muy buena resolución y permitieron estudiar la relación existente entre individuos y poblaciones mundiales, así como analizar la varianza genética existente en y entre las poblaciones (Kambhampati y cols., 1991; Urbanelli y cols., 2000). Sin embargo, las isozimas originaron problemas a la hora de detectar polimorfismos y, por tanto, su uso se restringió a estudios más descriptivos de la estructura de las poblaciones.

A principios del siglo XXI, se trabajó con nuevos marcadores de DNA como son los RFLP (*Restriction Fragment Length polymorphism*), los RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), y en la últimas décadas, con secuencias haplotípicas del DNA mitocondrial (*mtDNA*) (Citocromo b, COI, ND5), DNA ribosomal (*rDNA*) con sus tres subunidades altamente conservadas (*18rDNA*, *5.8rDNA* y *28rDNA*) separadas por dos espaciadores (ITS1 e ITS2). Algunas de estas técnicas mostraron ciertas limitaciones para detectar variabilidad genética y por ello, más recientemente, los microsatélites y los SNP (*Single nucleotide polymorphism*) han ayudado a complementar los estudios para esclarecer muchas de las incógnitas acerca de los patrones de flujo génico y la estructura genética de *Ae. albopictus* (Medley y cols., 2015). Estas técnicas han permitido diferenciar poblaciones a escala local, e incluso continental, y han ayudado a entender los procesos dispersivos de esta especie desde su área nativa original (Aguirre-Obando, 2017). Hay que tener en cuenta que los datos de los distintos trabajos son muy dispares como para proporcionar una síntesis de la historia demográfica de este mosquito (Goubert y cols., 2016).

Recientemente, Kotsakiozi y cols. (2017), utilizando SNPs, observaron que, a nivel mundial, existen dos grandes grupos genéticamente distantes y que incluyen

poblaciones de las áreas de origen y de aquellas donde ha tenido lugar la invasión. Así describieron que por un lado existe un grupo (*cluster 1*) formado por poblaciones de Japón, EEUU e Italia, confirmando lo que otros autores habían descrito (Urbanelli y cols., 2000; Birungi y Munstermann, 2002). Por otro lado, el *cluster 2*, agrupa poblaciones del sureste asiático como Malasia, Singapur y Vietnam, con poblaciones de Brasil, África y Grecia. Manni y cols. (2017), también sugirieron que Europa ha sufrido, al menos, dos procesos invasores por poblaciones de *Ae. albopictus* genéticamente diferentes.

Por otro lado, el interés por el mayor conocimiento de la estructura genética de esta especie invasora va más allá de la reconstrucción de las rutas plausibles de dispersión de *Ae. albopictus* a escala global. Se ha comprobado que el flujo génico de las poblaciones puede interferir en la difusión de alelos clave para la codificación de resistencias a insecticidas (Hemingway y cols., 2004; Low y cols., 2015; Chen y cols., 2016). Así, las poblaciones de Grecia, Brasil y Singapur comparten la misma mutación *kdr* F1534C, que otorga resistencias a piretroides y DDT (Xu y cols., 2016; Aguirre-Obando y Navarro-Silva, 2017), confirmando la posible agrupación de Kotsakiozi y cols. (2017) y mostrando la utilidad aplicada de los estudios de genética de poblaciones de mosquito tigre.

De igual manera, la variación genética afecta a la relación de los mosquitos con los patógenos que transmite y con el ambiente, de modo que distintas poblaciones genéticas pueden mostrar diferencias en la dinámica epidemiológica de dispersión y transmisión, lo que significa diferentes capacidades vectoriales (de Oliveira., 2003; Fernández y cols., 2004; Zouache y cols., 2014; Chouin-Carneiro y cols., 2016). Por lo tanto, conocer el origen de las invasiones puede sin duda considerarse una herramienta más, que complemente los protocolos de actuación de salud pública (Kotsakiozi y cols., 2017).

Finalmente, la reciente secuenciación del genoma completo de *Ae. albopictus* ha generado una importante herramienta de trabajo para el futuro. INFRAVEC en Europa, junto con un proyecto financiado por la Fundación Nacional de la Ciencia de China realizaron de forma independiente, pero casi simultánea, la secuenciación del genoma de poblaciones de *Ae. albopictus* criadas en laboratorio (Dritsou y cols., 2015; Chen y cols., 2015).

SEGUNDA PARTE:
CAPÍTULOS

I. Distribución de *Aedes albopictus*
(Skuse, 1894) en España (2011-2016).

I.1. Introducción

La distribución de una especie se suele identificar con la situación espacial de la misma, aunque se debe también contemplar la variable temporal. A este respecto, se han propuesto diversas clasificaciones de modelos ecológicos, siendo la de Gertsev y Gertseva, (2004) una de las más aceptadas. Estos investigadores señalan que la ecología es directamente dependiente del tiempo. Se pueden señalar principalmente dos variaciones temporales. Por un lado, la que se produce de manera histórica debido a procesos como la expansión del rango de distribución geográfica así como extinciones locales. Por otro lado, están aquellas que derivan de los cambios estacionales producidos por las modificaciones de los parámetros climáticos.

Desde el punto de vista de la Biogeografía, la expansión del rango de distribución en tiempo ecológico (no en tiempo evolutivo) se contempla bajo dos procesos fundamentales, la difusión o expansión en mancha de aceite y el salto dispersivo (Morrone, 2009). El primero de ellos se refiere a aumentos graduales en el borde del rango de distribución. El salto dispersivo, también conocido como dispersión a larga distancia, es un movimiento aleatorio en el que se aumenta el rango de distribución cruzando barreras y logrando el establecimiento de una población en un área nueva. En inglés, se diferencian los términos *dispersion* para los movimientos de los individuos dentro del rango de distribución de la especie, mientras que el término *dispersal* se refiere al salto dispersivo. Al no haber estas diferencias en español, se suelen producir confusiones al tratar ambos procesos.

El estudio de la dinámica poblacional estacional se denomina fenología. De forma general, se observan periodos de mínimos poblacionales en los periodos más adversos, generalmente el invierno por las bajas temperaturas (aunque puede haber mínimos por muy altas temperaturas y sequía) y máximos en los periodos favorables, con aumento de temperatura y precipitaciones.

I.1.1. Factores que influyen en la distribución

Aedes albopictus es la especie de mosquito invasor que más rápidamente se ha dispersado por todo el mundo (Gratz, 2004; Benedict y cols., 2007; Kraemer y cols., 2015). Originariamente zoófilo y asociado a los bosques tropicales del sureste asiático, inició su dispersión por los Océanos Índico y Pacífico (Delatte y cols., 2009) y, posteriormente, a los continentes americano y europeo (Medlock y cols., 2012; Carvalho y cols., 2014). El éxito de su expansión geográfica se debió a diferentes factores. En primer lugar, la dispersión pasiva gracias a huevos resistentes a la desecación adheridos a mercancías (Reiter y Sprenger, 1987). En segundo lugar, el transporte accidental de adultos en el interior de vehículos (Flacio y cols., 2004; Eritja y cols., 2017). Todo ello facilitado por su particular plasticidad fisiológica, genética y ecológica (Hawley, 1988). Por ejemplo, se ha señalado la capacidad de adaptarse a climas templados al inducir la diapausa en los huevos invernantes, existiendo poblaciones tropicales sin esta facultad y poblaciones de zonas templadas que sí la realizan con diferentes *fotoperiodos críticos* (fotoperiodo que induce la diapausa al 50% de

la población) (Leinshman y cols., 2011; Ambruster, 2016). Este hecho interfiere en las resistencias de dichas poblaciones a las bajas temperaturas de los huevos de diapausa, siendo más resistentes los de latitudes más frías (Hawley y cols., 1989). También ha conseguido colonizar multitud de lugares disponibles en áreas urbanas y periurbanas.

La temperatura afecta de forma crítica a la dinámica de poblaciones de mosquitos y, por ser un factor limitante en el establecimiento, ha sido el factor más empleado en los modelos predictivos de nuevas áreas de expansión. Se ha observado que la temperatura media del mes más frío (enero en el hemisferio norte) por debajo de entre -10°C a -5°C (estudios de campo en varios países) no permite el establecimiento de esta especie (Waldock y cols., 2013), siempre y cuando se trate de las poblaciones de tipo templado con capacidad de producir huevos de diapausa. Para las poblaciones tropicales (sin capacidad de diapausa), éste umbral se eleva hasta la temperatura límite que permite vivir a las larvas y pupas, que está en torno a los 10°C (Waldock y cols., 2013). Las bajas temperaturas también afectan a los adultos. Por debajo de 13°C, las hembras interrumpen la búsqueda de hospedadores. Por debajo de 9°C, cesan su actividad (Roiz y cols., 2010). Por el contrario, se han estimado que las temperaturas por encima de 40°C resultan letales para todas las fases del ciclo (salvo resguardos microclimáticos) (Waldock y cols., 2013).

Otro factor climático considerado, aunque más recientemente, es la precipitación. En distintos lugares se ha observado una relación positiva entre lluvia y los picos de población y el establecimiento de esta especie, pero en otros casos no se observa (Waldock y cols., 2013; Roiz y cols., 2015). Este es un factor bastante complejo de estudiar porque hay que identificar cuál es la relación entre la precipitación y el mosquito tigre. Porque, además, influye en la humedad relativa, la cual afecta a los huevos y a los adultos (Dickerson, 2007; Murdock y cols., 2017). La hipótesis más habitual es que las lluvias proporcionan los lugares de cría necesarios para el mosquito tigre (poblaciones lluvia-dependientes), aunque evidentemente existen poblaciones no lluvia-dependientes (Waldock y cols., 2013). Sólo una influencia negativa ha sido señalada en la relación entre precipitación y *Ae. albopictus*. En el caso de fuertes precipitaciones, las lluvias torrenciales pueden arrastrar a los inmaduros (Dieng y cols., 2012).

Con el tiempo, se ha podido comprobar que otros factores como el uso del suelo, del agua, así como factores socio-económicos, pese a ser difícilmente cuantificables, deben ser integrados en los modelos, para hacerlos más realistas y por lo tanto más útiles (Nagao y cols., 2003, Kraemer y cols., 2015).

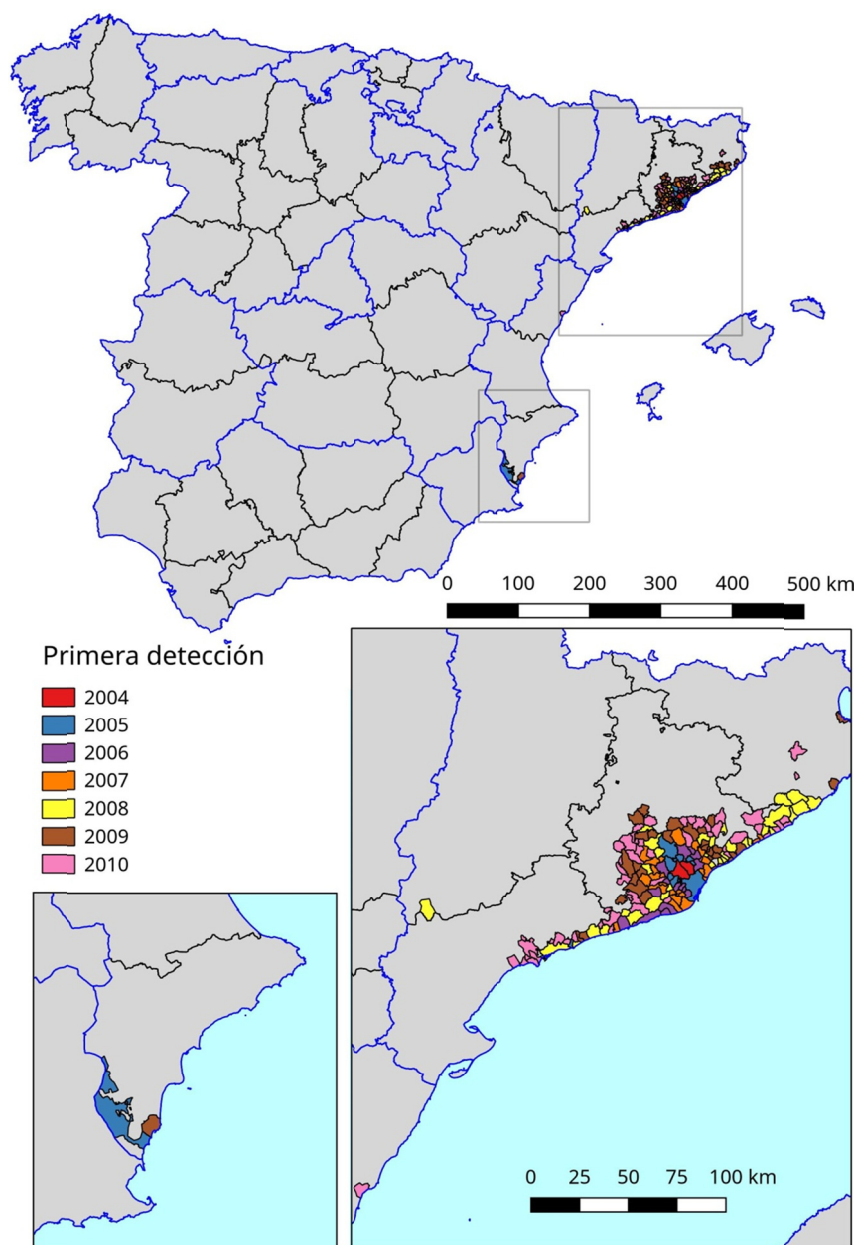
I.1.2. Distribución geográfica conocida en España 2004-2010.

Tras la primera detección en Europa (Albania en 1979), en muchos países europeos se comenzó la vigilancia entomológica por el miedo a su llegada. Actualmente, se ha detectado en 28 países, aunque solo se considera establecida en 21 (ECDC, 2017; Marabuto y cols., 2018; Costa-Osório y cols., 2018). La obvia situación de riesgo de colonización de la Península Ibérica (Knudsen y cols., 1996; Eritja y cols., 2005) llevó, a

partir de 2003, a realizar estudios prospectivos en el marco de la red científica multidisciplinar EVITAR (*Enfermedades Víricas Infecciosas Transmitidas por Artrópodos y Roedores*) pero no se obtuvieron evidencias de la presencia de *Ae. albopictus* (Roiz y cols., 2007). Sin embargo, a raíz de un incremento de consultas en atención primaria por picaduras de insectos (Giménez y cols., 2006) en el municipio barcelonés de San Cugat del Vallés, se realizó en 2004 un estudio de campo que confirmó, por primera vez, la presencia de esta especie invasora en España (Aranda y cols., 2006). El mosquito tigre se expandió rápidamente por la provincia y poco a poco al resto de Cataluña (Torrell-Sorio y Fernández-Rodríguez, 2008; Roiz y cols., 2007; Roiz y cols., 2008). De forma puntual, se detectó en una urbanización de la costa de Orihuela (Alicante) a raíz del aviso por parte de un turista que residía habitualmente en Barcelona (Roiz y cols., 2007).

En 2007, entra en vigor el Reglamento Sanitario Internacional (OMS, 2005). En los capítulos II, IV y el Anexo B, se incluye, entre otros aspectos, la obligación por parte de los Estados miembros de la Organización Mundial de la Salud de establecer un programa de vigilancia y control de vectores en y alrededor de los potenciales puntos de entrada (principalmente puertos y aeropuertos). En 2009, el Ministerio de Sanidad incluye, dentro del “*Plan nacional de vigilancia entomológica en aeropuertos y puertos frente a vectores importados de enfermedades infecciosas exóticas, y vigilancia de potenciales vectores autóctonos de dichas enfermedades*”, el objetivo de realizar una búsqueda de *Ae. albopictus* por zonas potenciales de expansión en España. Este estudio se realiza fuera de la Comunidad Autónoma de Cataluña, la cual ya tenía establecido un programa propio de seguimiento y control de la especie. En poco tiempo, se comprobó que el mosquito tigre se había establecido en el sur de la Comunidad Valenciana (Delacour y cols., 2009). En 2010, el aviso de un vecino de Benicassim dió lugar a un muestreo entomológico que confirmó la presencia de la especie invasora, por primera vez, en la provincia de Castellón (Delacour y cols., 2010). Esto puso en evidencia que las poblaciones de mosquito tigre estaban en plena expansión por la cuenca mediterránea, probablemente mediada por vehículos a través de las principales carreteras como anteriormente había sido descrito en Estados Unidos, Italia y Francia (Moore y Mitchell, 1997; Flacio y cols., 2004; Roiz y cols., 2007). Considerando que la distribución de *Ae. albopictus* está estrechamente relacionada con las condiciones climáticas. Los primeros modelos bioclimáticos predictivos basados en datos de temperatura y pluviometría de las zonas donde el vector ya estaba establecido, consideraban principalmente la cornisa cantábrica como área de posible expansión geográfica de la especie y no señalaban al sureste de España como un área especialmente sensible para su asentamiento (ECDC 2009). Sin embargo, su comentada capacidad de adaptación hizo que, incluso en lugares con valores bajísimos de precipitación anual, las hembras encontraran acomodo a la hora de reproducirse (Eritja y cols. 2005, Roiz y cols. 2007).

Figura 15. Distribución conocida de *Ae. albopictus* en España 2004-2010



I.1.3. Mosquito tigre y salud pública en España

El interés por un mejor conocimiento de la distribución de esta especie radica en la necesidad de controlarla, tanto por su carácter de especie invasora (Real Decreto 630/2013, última modificación 17/6/2016), como por su relación con la salud pública. Respecto a este segundo aspecto, es responsable de la considerable pérdida de calidad de vida en ciertas zonas (Halasa y cols., 2014) a consecuencia de su agresividad y marcada antropofilia. Pero el papel que ocupa como vector de enfermedades reemergentes en Europa es la principal causa de preocupación. *Ae. albopictus* está implicado en los recientes brotes de chikunguña y dengue acontecidos en países cercanos (Rezza y cols., 2007; La Ruche y cols., 2010; Grandadam y cols., 2011; Marchand y cols., 2013; Delisle y cols., 2015; Manica y cols., 2017). Además, en los últimos años diversos estudios han señalado que es competente para la transmisión del

virus zika aunque en menor grado que *Ae. aegypti* (Grard y cols., 2014; Di Luca y cols., 2016; Jupille y cols., 2016; Chouin-Carneiro y cols., 2016; Heitman y cols., 2017; Liu y cols., 2017), hasta que se detectó en ejemplares de México (PAHO, 2016; Huerta y cols., 2017). Considerando la estrecha conexión y cercanía histórica, cultural y social que existe entre América Latina y España, no cabe duda de que los brotes epidémicos que ocurren en países endémicos pueden repercutir de forma directa en nuestro entorno (González y cols., 2017).

En 2016, se publicó el Plan Nacional de Preparación y Respuesta frente a enfermedades transmitidas por vectores (Dengue, Chikunguña y Zika) (CCAES, 2016). En él, se recogen los aspectos a tener en cuenta para prevenir y/o controlar la transmisión autóctona de estas enfermedades emergentes mediante la puesta en marcha de protocolos de vigilancia epidemiológica y entomológica, hecho que requiere de una gran coordinación para que sean eficientes (Millet y cols., 2017). El CCAES (2016) reporta datos que reflejan que, desde 2014, se ha incrementado el número y el tipo de arbovirosis importadas. Suelen notificarse mayormente en Cataluña y Madrid, como también reportan González y cols., (2017) y Millet y cols., (2017). Estos datos señalan que existe un riesgo real y considerable de aparición de brotes autóctonos, sobre todo en aquellos lugares en los que coincidan pacientes en fase virémica (que hasta la fecha han sido siempre casos importados) y el vector competente (*Ae. albopictus*). El riesgo será mayor en aquellas zonas que reciban mucho flujo de viajeros provenientes de zonas endémicas y el mosquito tigre esté muy establecido y con altas densidades poblacionales (Rocklov y cols., 2016). Este riesgo será mayor, sobre todo, en los meses de verano cuando aumenta la temperatura y, por consiguiente, la capacidad vectorial.

I.1.4. Justificación y objetivos

Dado el impacto sanitario de estas enfermedades vectoriales, su rápida dispersión a nivel global y la ausencia de medidas profilácticas (vacuna) o terapéuticas (tratamiento específico) el conocimiento de la distribución actual del vector en España, es la base para el diseño de estrategias para el control de transmisión de dichas enfermedades (Semenza y cols., 2014; Messina y cols., 2015). La generación de mapas actualizados de la presencia del vector puede mejorar los esfuerzos para entender la epidemiología espacial de las arbovirosis asociadas, así como predecir cómo éstas pueden fluctuar en el futuro (Kraemer y cols., 2015). De igual manera, la caracterización de la dinámica estacional de las poblaciones, así como los parámetros medioambientales que la modelan, será esencial para controlar a los vectores y minimizar, por tanto, el impacto de futuros brotes de enfermedades en España.

Los objetivos de esta sección de la tesis doctoral corresponden con los dos primeros planteados:

- i. Estudio de la biogeografía de *Ae.albopictus* en España: rango de distribución y modificación del mismo a lo largo del tiempo.
- ii. Conocimiento de la dinámica estacional de la especie en zonas geográficamente distantes.

I.2. Material y métodos

I.2.1. Descripción del área de estudio

España, ubicada al suroeste de Europa, comprende parte de la Península Ibérica (el 85% del territorio), los archipiélagos de las Canarias y de Baleares, así como las ciudades de Ceuta y Melilla, en África. Sus costas están bañadas al norte con el mar Cantábrico, al oeste con el océano Atlántico (comparte territorio peninsular con Portugal) y al este y el sur por el mar Mediterráneo. Tiene una superficie de 506.030 km², incluidos los territorios africanos e insulares. Se localiza aproximadamente entre 43° 47' 24" N. (Estaca de Bares) y los 36° 00' 03" S. (Punta de Tarifa) de latitud, y entre los 7° 00' 29" E. (Cabo de Creus) y 5° 36' 40" O. (Cabo de Tourinam) de longitud. (Instituto geográfico Nacional, 2017).

El relieve de España se articula en torno a la gran Meseta Central que ocupa la mayor parte del centro de la Península Ibérica. Fuera de la meseta, están la depresión del río Guadalquivir, situada al suroeste y la del río Ebro, en el noreste. Las principales cadenas montañosas se encuentran al norte, Cordillera Cantábrica y los Pirineos (frontera natural con Francia), al este el Sistema Ibérico y Sierra Morena al sur (Aliaga, 2010).

Figura 16. Mapa físico de España (Gifex, 2009)



Con la excepción de Suiza, España es el país más elevado de Europa, con una altitud media de 600 msnm. Una sexta parte del territorio tiene una elevación de más de 1.000 msnm, y más de la mitad del mismo se encuentra entre 500 y 1000 msnm. Aunque España se encuentra en la zona templada, su accidentado relieve da lugar a una gran diversidad de climas influidos también por los vientos, las precipitaciones y la

temperatura. Se describen principalmente tres zonas climáticas: la mediterránea, caracterizada por inviernos templados (salvo en el interior o las montañas) y veranos muy calurosos, con pocas precipitaciones y déficit hídrico. La atlántica, con elevada precipitación y temperaturas templadas (inviernos suaves y veranos frescos). La continental caracterizada por temperaturas más extremas con inviernos muy fríos y veranos muy calurosos, aunque últimamente se define como mediterránea de carácter continental. Canarias posee un clima subtropical, con temperaturas templadas y precipitaciones variables según las islas, la orografía y la orientación.

Las montañas del Cantábrico marcan la primera zona de división climatológica bien definida. Al norte de esta cadena, en la estrecha franja del norte, donde se sitúan el País Vasco, Cantabria, Asturias y Galicia, se encuentra lo que podríamos llamar la España lluviosa, con un clima marítimo por excelencia, solamente con ligeras variaciones de temperatura, suaves inviernos y veranos frescos, un cielo casi constantemente nublado y frecuentes lluvias, aunque menores durante el verano. Al sur de la cadena cantábrica, se encuentra la España seca, con un clima extremadamente variable, siempre caracterizado por escasas lluvias y mucho sol y tormentas ocasionales de corta duración (Instituto geográfico Nacional, 2017).

La situación geográfica (entre la zona templada y la zona tropical), su orografía y su posición entre dos continentes y entre un mar y un gran océano, induce una gran variabilidad climática. Por ello, en España se pueden aplicar o adaptar clasificaciones climáticas mundiales como la de Köppen (1918) y la de Walter (1977), aunque algunos autores como Rivas-Martínez (1983) y López-Fernández y cols., (2008) han realizado clasificaciones bioclimáticas específicas para esta región.

I.2.2. Diseño general del estudio

En primer lugar, hay que destacar que los datos de los que se ha hecho uso provienen de distintas fuentes, por un lado los resultantes del proyecto del Ministerio de Sanidad, Asuntos Sociales e Igualdad, “*Vigilancia entomológica en aeropuertos y puertos frente a vectores importados de enfermedades infecciosas exóticas, y vigilancia de potenciales vectores autóctonos de dichas enfermedades*” y colaboraciones asociadas.

La colocación de trampas y de recogidas periódicas de las tablillas se ha realizado con la colaboración de diferentes grupos de trabajo, como Universidades y centros de investigación, profesionales de control de plagas e, incluso, técnicos de los ayuntamientos, vinculados directa o indirectamente con el estudio. Esto hace que el protocolo de muestreo no se pueda contemplar como un método sistemático e uniforme, sino que hay importantes variaciones debido a las limitaciones e intereses de cada uno de estos participantes.

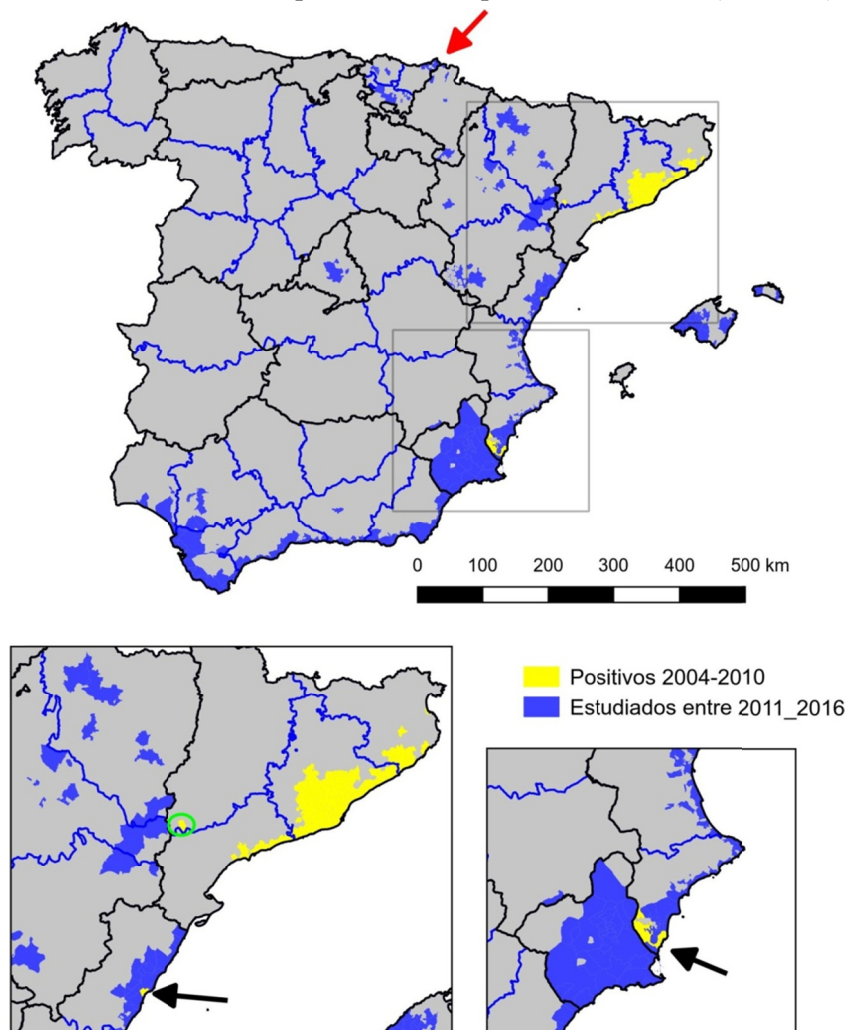
I.2.2.1. Selección de lugares de muestreo

El diseño del plan y la elección de municipios se vieron modificados a lo largo del periodo de estudio.

Inicialmente, la colocación de trampas se planteó respecto a las referencias de que, pese a que el mosquito tigre es una especie de origen tropical que cría en huecos de los árboles, se había adaptado muy bien a ambientes urbanos y suburbanos. Entonces, en el área mediterránea, donde la urbanización está muy concentrada al tiempo que se combina con importantes manchas de vegetación antropizada de distinta naturaleza (jardines, huertas, patios con macetas, rotondas ajardinadas, etc.) se podría haber producido una difusión gradual debido a su baja capacidad de dispersión propia. A este aspecto de movilidad reducida se le añadió la posibilidad de un desplazamiento artificial mayor mediado por el transporte por carretera

De modo que, se procedió inicialmente a la colocación de trampas en los municipios positivos conocidos, así como en sus colindantes, conectados por principales vías de comunicación; además de incluir Baleares (debido al intenso tráfico marítimo con Cataluña). En el transcurso de los años, se fue abarcando cada vez más territorio tanto por la propia expansión del mosquito tigre como por el aumento de colaboradores en el estudio.

Figura 17. Municipios estudiados en este trabajo (azul) y municipios anteriormente detectados positivos en el periodo 2004-2010 (amarillo)



A partir de 2013, tras confirmarse la presencia de *Ae. albopictus* en el suroeste de Francia, justo en la zona fronteriza con el País Vasco (<https://www.eidatlantique.eu/page.php?P=153>), se decidió iniciar la vigilancia en zonas con cierto riesgo de introducción mediante vehículos, como era el caso del norte de España.

En 2014, un informe positivo a la presencia de *Ae. albopictus* en la provincia de Málaga, por parte de la plataforma de ciencia ciudadana “AtrapaelTigre” (actualmente “MosquitoAlert”), daba a entender que esta especie invasora estaba avanzando mucho más rápido de lo esperado. Este hecho se confirmaba un año más tarde cuando, también a través de este proyecto se señalaba la presencia de la especie, por primera vez, en territorios del interior de la península, concretamente en Huesca. Así, en 2016, la Dirección General de Salud Pública del Gobierno de Aragón, decidió poner en marcha la vigilancia entomológica en las tres provincias.

De acuerdo a la bibliografía (Roiz y cols. 2007; Carrieri y cols. 2011) y la propia experiencia a lo largo del estudio, las zonas elegidas para la colocación de las trampas fueron principalmente, áreas de servicio (por la constante parada de vehículos que pudieran transportar insectos en su interior), cementerios (lugares habituales de cría del mosquito en floreros), complejos residenciales (con abundante vegetación) así como zonas comunes en zonas urbanas como parques o viveros. Además, se tuvo en cuenta las relaciones comerciales y turísticas, con zonas donde se conoce que existen poblaciones de *Ae. albopictus* establecidas.

Así, como se observa en la Figura 16, a lo largo del periodo comprendido entre 2011 y 2016, se trabajó en nueve comunidades autónomas y 21 provincias. Un total de 280 municipios fueron estudiados en los cuales se colocaron 7002 trampas repartidas en 3629 puntos.

I.2.2.2. Metodología de captura y muestreo

Se emplearon trampas de ovoposición, con frecuencia elegidas para la vigilancia de vectores del género *Aedes* (Becker, 2003) y, en concreto, de *Ae. albopictus* (Romi y cols., 2003) y otras especies cercanas, como *Ae. aegypti* (Bracks y cols., 2004), ya que las mismas mimetizan los hábitats naturales de cría (Di Luca y cols., 2001). La metodología consiste en la colocación de un recipiente, generalmente de color oscuro, en cuyo interior se sumerge en agua una tablilla de madera. La hembra depositará los huevos sobre la tablilla, que se recogerá y repondrá periódicamente.

Cada una de las trampas se localizó anotando la dirección de la localidad y algunas características ecológicas como la vegetación cercana. Además, fueron georeferenciadas mediante la utilización de GPS y Google Earth para facilitar la elaboración de mapas.

El período de muestreo no fue sistemático ni estandarizado. El inicio, el fin y la duración de los muestreos fue variable en función del área de estudio debido a deferentes circunstancias como la disponibilidad de personal así como de

presupuestos. Cada una de las estaciones se revisó con periodicidad semanal o quincenal, dependiendo de la zona. En este proceso, se retiraba cada una de las tablillas, introduciéndose en bolsas de plástico correctamente identificadas y remplazándola por una nueva pieza de madera en la trampa. El agua era sustituida en cada visita después de ser examinada en busca de larvas o pupas vertiéndola en una bandeja de plástico. En caso de encontrarlas, se recogieron mediante una pipeta y se almacenaron en alcohol de 70°, correctamente etiquetados.

I.2.2.3. Identificación taxonómica

En el laboratorio, cada tablilla se examinó con estereomicroscopio a 30 aumentos en busca de huevos. Si se encontraban, se procedía al recuento exacto. Cada una de las caras de la tablilla era examinada, incluyendo los bordes, donde se puede localizar presencia de huevos. Las tablillas positivas se guardaron a temperatura ambiente (20°C) y se dejaron secar aproximadamente 7 días. A fin de confirmar la identificación taxonómica, se realizó una eclosión controlada en laboratorio de bioseguridad 2. Para ello, se sumergieron las tablillas en agua limpia libre de cloro siguiendo el protocolo de Alarcón-Elbal y cols. (2010). La identificación de los ejemplares resultantes fue por identificación en estado de adulto (sacrificados por congelación) o mediante el sacrificio de las larvas de cuarto estadio. Éstas últimas fueron fijadas en alcohol de 70° para posteriormente ser montadas con líquido de Hoyer e identificadas al microscopio siguiendo las claves taxonómicas de Schaffner y col. (2001). Al tratarse de un vector invasor, se tomaron máximas precauciones para llevar a cabo la cría en laboratorio, con el fin de evitar dispersión accidental. Después del estudio, todas las trampas de oviposición usadas, las bolsas y las tablillas se destruyen hirviéndolas (>100°C) durante 20 minutos para neutralizar los huevos, siendo luego incineradas.

La abundancia de trampas fue variable en función del tamaño del municipio así como de la disponibilidad de ambientes propicios para su colocación. Del mismo modo, el volumen de agua de cada trampa tampoco fue estándar dado que la evaporación varía en función del área geográfica en la que se trabajó. Por ejemplo en el País Vasco se trabajó con trampas de 250 ml de capacidad y en el resto de municipios se empleó recipientes de, al menos, 700 ml.

I.2.2.4. Distribución de los puntos de muestreo

Se utilizó el programa Google Earth, y su prestación Street View, para preseleccionar las zonas de cada municipio (puntos) más adecuadas para la colocación de las trampas. Una vez sobre el terreno, se situó cada ovitrampa en un microhábitat aparentemente adecuado (existencia de vegetación o refugio para adultos, con humedad y en sombra una buena parte del día). Hasta 2013, se colocaban las trampas en puntos separados de aproximadamente 50-100 metros, repartidos aleatoriamente por zonas verdes del municipio. A partir de 2014, se decidió seguir las recomendaciones de la guía del ECDC, (2012) y se procedió a colocar en cada punto al menos dos estaciones de muestreo con el fin de obtener pseudorélicas que aportasen datos más precisos de la vigilancia. De este modo, también se pueden minimizar las

pérdidas de información de un punto por desaparición de las muestras y los falsos negativos por error de muestreo.

Tabla 2. Total de municipios muestreados a lo largo del periodo de estudio. En rojo, aquellos muestreos derivados de la aplicación de ciencia ciudadana “Atrapaeltigre”, actualmente “MosquitoAlert”

CCAA	PROVINCIA	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Comunidad Valenciana	Castellón	3	12	23	5	1	1
	Valencia		10	15	18	6	2
	Alicante	4	10	24	10	3	7
Islas Baleares	Mallorca	1	6	1	17	17	26
	Menorca					2	
Región de Murcia	Murcia	2	2	13	25	33	30
Andalucía	Almería				9	14	14
	Granada				4	8	8
	Málaga				1	15	15
	Cádiz					16	18
	Sevilla					7	8
	Huelva					3	6
	País Vasco	Guipúzcoa			3	4	1
	Vizcaya					3	5
	Álava			1	1	2	3
Aragón	Huesca					1	7
	Zaragoza						10
	Teruel						5
Madrid	Madrid						2
Castilla la Mancha	Albacete				1		

I.2.3. Análisis de datos

Con los resultados del estudio se tuvieron en cuenta tres variables poblacionales. Por un lado, la presencia de *Ae. albopictus* como un valor dicotómico de presencia o ausencia (positivo/negativo). En segundo lugar, el porcentaje de positividad, expresado como el número de veces que una estación concreta fue positiva. Finalmente, el número medio de huevos por trampa positiva. Aunque, como se discutirá más adelante, no siempre se produce una correlación entre el número de hembras y los huevos colectados en las ovitrampas, se suele elaborar una pseudofenología (término acuñado en Collantes y cols., 2015 para este concepto) con estos datos que, de alguna forma tratan de reflejar las variaciones de densidad poblacional a lo largo del tiempo.

Para la realización de los mapas, se utilizó el programa informático Quantum GIS y para los diagramas de cajas del capítulo de distribución se utilizó el programa Rstudio V.1.423.

I.3. Resultados

Los resultados detallados de la vigilancia en el periodo de estudio se encuentran en la tabla 1 del anexo.

I.3.1. Distribución temporal

I.3.1.1. Provincia de Castellón

Aedes albopictus se detectó por primera vez en esta provincia en 2010. Hoy se considera bien establecido. La Figura 26 muestra las densidades de huevos así como el porcentaje de tablillas positivas a lo largo de los dos años que duró el estudio (2015-2016). Se colocaron nueve trampas repartidas por el municipio, la recogida de las tablillas fue quincenal.

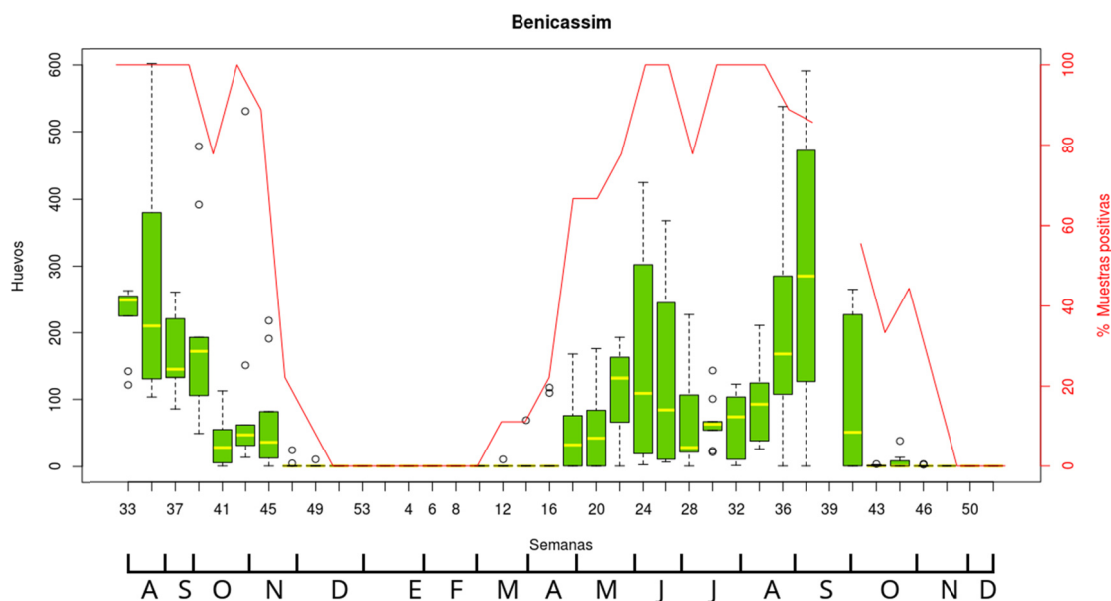
El año 2015, el seguimiento se inició ya a mitad de temporada, por lo que no se tienen datos del inicio. El máximo de abundancia de huevos se observa en la semana 35 (agosto) y una mediana de huevos/trampa superior a 200. A partir de la semana 37, se produjo una disminución importante de la cantidad de huevos aunque el porcentaje de puntos positivos se mantuvo muy elevado hasta que, en la semana 47 (mediados de noviembre), solo dos tablillas presentaron huevos. El fin de registros de la temporada ocurrió en la semana 49 (diciembre de 2015). El porcentaje de muestras positivas se relaciona con el grado de difusión de *Ae. albopictus* en el periodo de máximo desarrollo de la población, y no tanto con el número de huevos/trampa, que a su vez puede asociarse a la abundancia poblacional (Gavaudan y cols., 2011).

La actividad, en 2016, se reinició a finales de marzo (semana 12) con diez huevos en la primera tablilla positiva. A partir de la semana 18 (mayo), se observa un aumento gradual tanto de número de huevos como de porcentaje de tablillas positivas. El primer pico se registra en la semana 24, en junio (con una mediana cercana a los 100 huevos/trampa y el 100% de muestras positivas). Tras una bajada a mitad de verano, el segundo pico y principal fue en septiembre, semana 38 (con una mediana de aproximadamente 300 huevos/trampa y una difusión aparente del mosquito muy elevada). Posteriormente, tuvo lugar un descenso brusco de actividad registrando la última muestra positiva en la semana 46, (noviembre).

En ambos años, los valores máximos se sitúan en septiembre (semana 35, 2015; semana 37, 2016). El descenso se produce entre mediados de octubre y noviembre, lo cual dependerá de la llegada de las bajas temperaturas de final de otoño.

El porcentaje de muestras positivas parece acompasarse de forma general al aumento de huevos. Entre junio y agosto se mantiene más del 70% de positivos, siendo incluso el 100%.

Figura 18. Abundancia de huevos de *Ae. albopictus* por trampa y porcentaje de muestras positivas registradas a lo largo de los dos años de estudio (2015 y 2016) en Benicassim



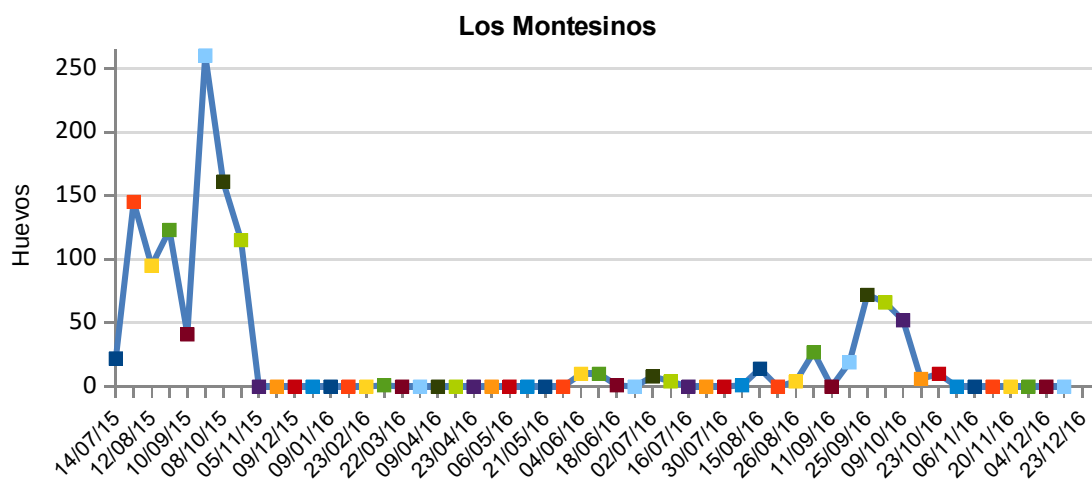
Se ha observado una correlación exponencial positiva entre el porcentaje de muestras positivas y las medianas y medias de huevos por semanas con $R^2=0,8947$ y $R^2=0,895$ respectivamente.

I.3.1.2. Provincia de Alicante

En el periodo de vigilancia de la especie en los Montesinos, iniciado en 2015 se colocó una trampa y se hizo seguimiento quincenal mostrando dos picos de abundancia de huevos en 2015, uno a finales de julio con 145 huevos y el segundo a finales de septiembre con 260, siendo la última tablilla positiva el 22 de octubre con más de 100 huevos.

En 2016, el seguimiento fue semanal y se detectó la primera puesta el 8 de marzo con un único huevo. No hubo más actividad en la trampa hasta que en junio se contaron 14 huevos en la tablilla, el máximo de huevos se alcanzó en septiembre con 72 huevos, una cuarta parte que en 2015. La última tablilla positiva se recogió el 23 de octubre.

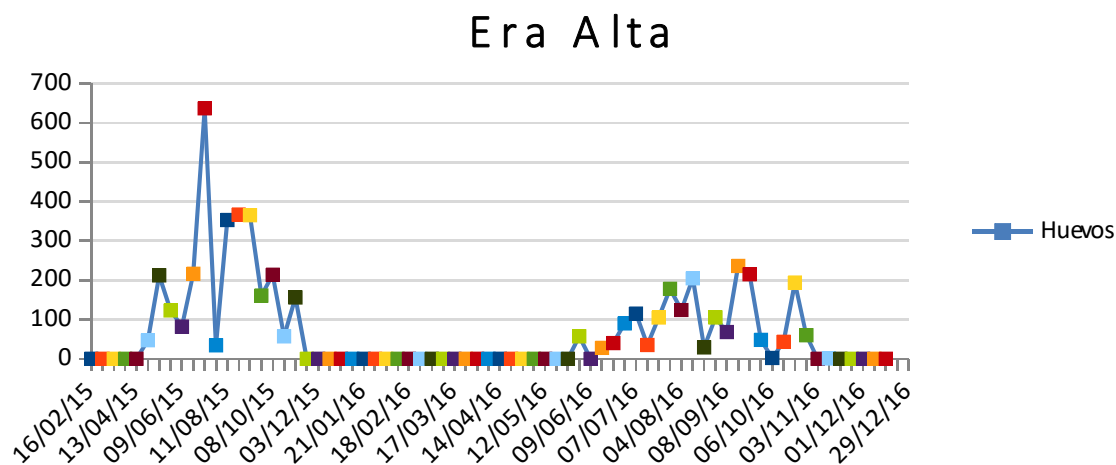
Figura 19. Número de huevos de *Ae. albopictus*, contabilizados en el periodo de estudio 2015 y 2016 en una trampa de Los Montesinos



I.3.1.3. Provincia de Murcia

Cuatro años después de la primera detección de *Ae. albopictus* en la comunidad, se decidió vigilar quincenalmente en la Era Alta, con la colocación de una trampa de manera continuada con el fin conocer mejor sus ciclos de actividad.

Figura 20. Número de huevos de *Ae. albopictus*, contabilizados en el periodo de estudio 2015 y 2016 en una trampa de la Era Alta



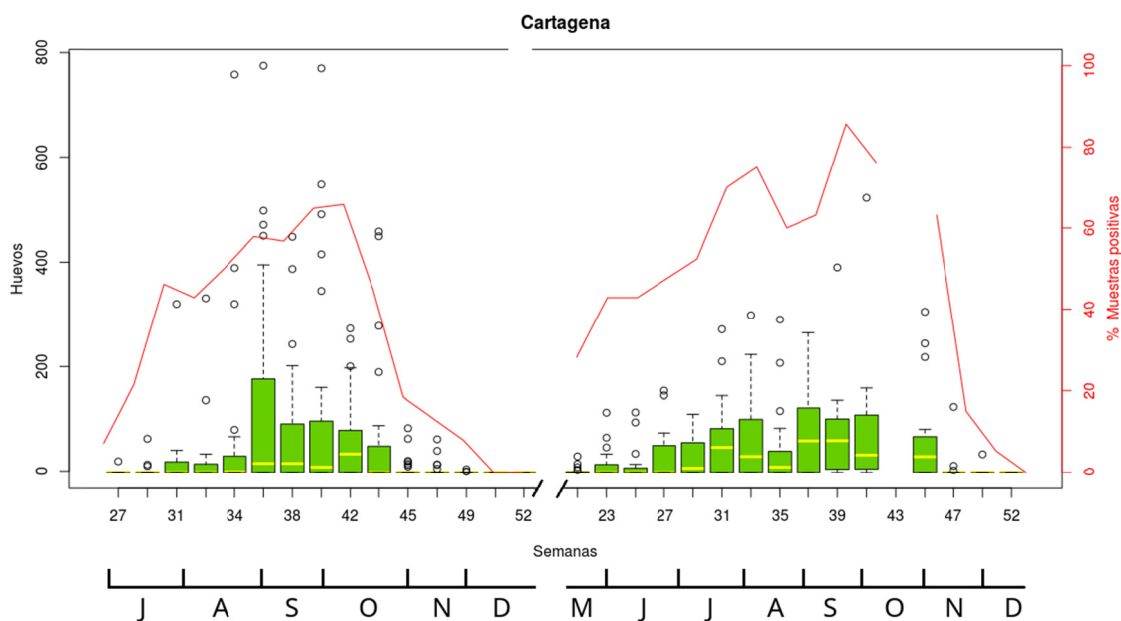
Así, la primera tablilla positiva en 2015 fue el 27 de abril y poco después tuvo lugar un primer pico de abundancia de huevos, el 11 de mayo con 212 huevos. El segundo pico se registró el 6 de julio con 637 huevos. Tras un considerable descenso, a partir de mediado de agosto aumentó de nuevo la densidad de huevos y se mantuvo alta (>300) hasta que a partir de octubre comenzó a disminuir dando un pequeño repunte a principios de noviembre para después desaparecer.

En 2016, el seguimiento fue semanal y la primera puesta se registró el 2 de junio. Posteriormente hubo un aumento gradual de la densidad de huevos con algunos picos

pero con densidades mucho menores que el año anterior. La última tablilla positiva tenía un huevo y se recogió el 24 de noviembre.

Por otro lado, en Cartagena, se capturó de manera general con frecuencia quincenal. En 2015 se colocaron 53 trampas en 38 puntos y, en 2016, 42 trampas en 21 puntos. A diferencia de los otros seguimientos, en este caso se manejan datos de capturas de todas las localidades estudiadas durante los años 2015 y 2016 en el municipio de Cartagena. Esto representa que no se alcanzó en ningún momento el 100% de puntos positivos simplemente porque no se partía desde un set de localidades anteriormente ya positivas. En cambio, esto si ocurrió con las otras áreas donde se estudiaron puntos que a priori ya se sabía que eran positivos.

Figura 21. Abundancia de huevos de *Ae. albopictus* por trampa y porcentaje de muestras positivas registradas a lo largo de los dos años de estudio (2015 y 2016) en Cartagena



El primer año, la primera puesta se detectó en la semana 27, a principios de julio y se observó un aumento gradual de huevos hasta alcanzar un pico en la semana 36, a finales de agosto. La última tablilla positiva corresponde a la semana 49, a finales del mes de noviembre. La mediana se mantuvo por debajo de 50 huevos/trampa, sin embargo muchas trampas mostraron valores atípicos y notablemente superiores al resto (aparecen como círculos en la Figura 21). La mayor difusión del mosquito (mayor porcentaje de muestras positivas) se alcanzó en la semana 42 coincidiendo con la mediana más alta de ese año.

En 2016, los primeros huevos se contabilizaron en las tablillas de la semana 21, mediados de mayo, alcanzando un primer pico de abundancia en la semana 33, la primera de agosto. De manera general, se observó un aumento en la mediana de huevos/trampa, así como una mayor difusión de *Ae. albopictus* por

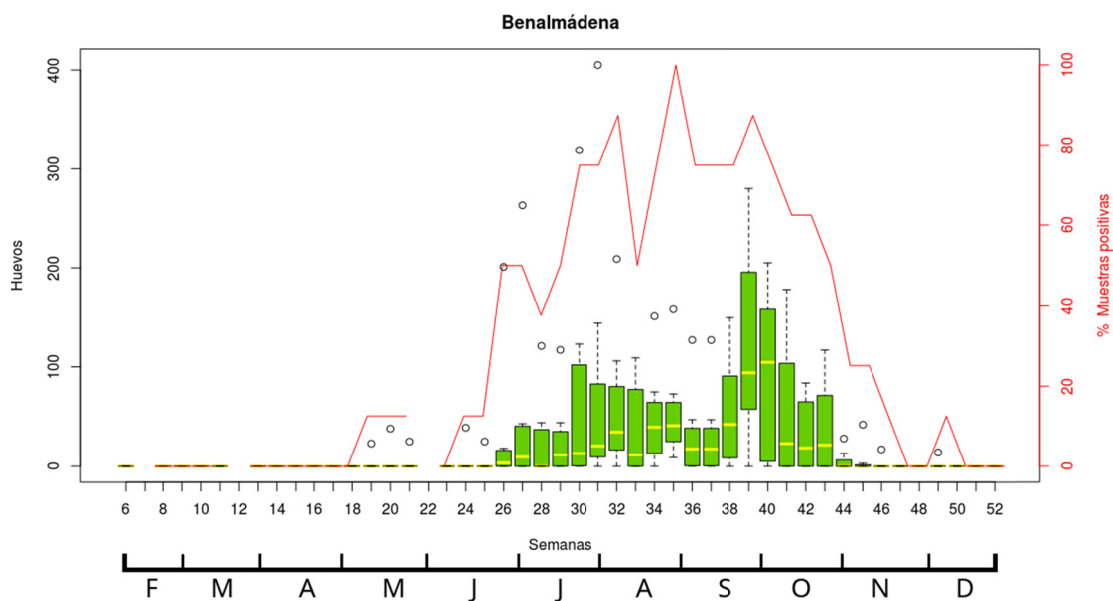
el municipio alcanzándose un máximo de 80% de muestras positivas en la semana 37, en septiembre, coincidiendo con el pico de máxima abundancia de huevos/trampa. La última trampa positiva se registró en la semana 49, en diciembre.

Se ha encontrado correlación exponencial positiva entre el porcentaje de positivos y el promedio de huevos con $R^2=0,8815$.

I.3.1.4. Provincia de Málaga

En 2015 quedó confirmado que el mosquito estaba en pleno proceso de expansión por Andalucía y de manera más marcada en la provincia de Málaga. Así, con el fin de saber si las poblaciones en el sur seguían activas en invierno o si el periodo de actividad era mayor, se inició el seguimiento en febrero de 2016. Se hizo un seguimiento semanal durante dos años. En Alhaurin de la Torre se colocaron cinco trampas, cuatro en Torremolinos y ocho en Benalmádena.

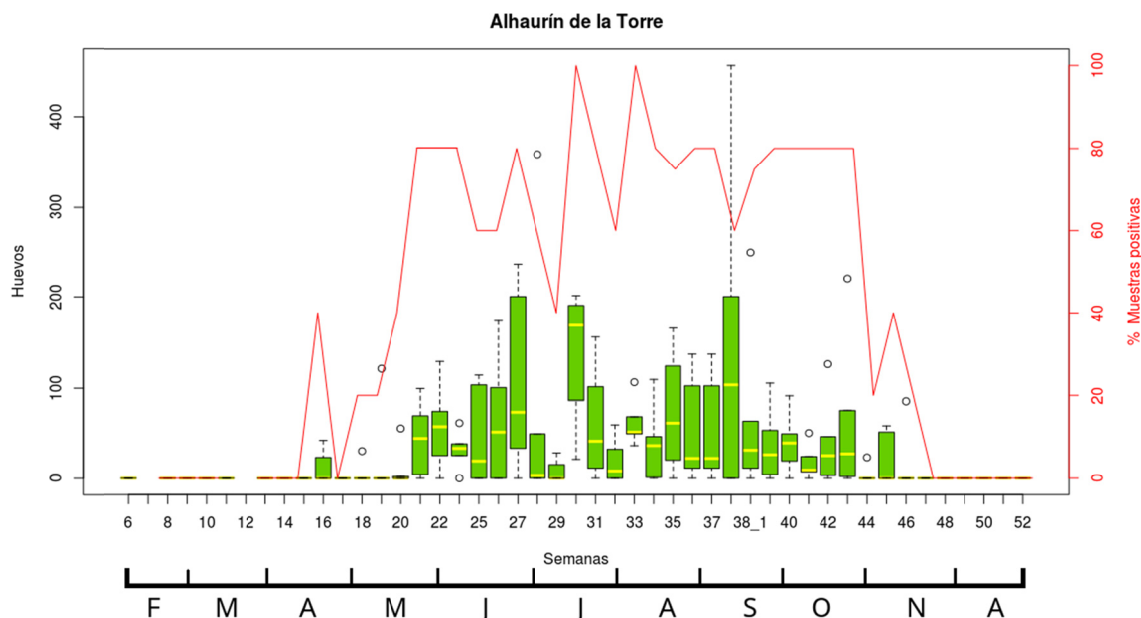
Figura 22. Abundancia de huevos de *Ae. albopictus* por trampa y porcentaje de muestras positivas registradas a lo largo de 2016 en Benalmádena



Como se puede ver en la Figura 22, en 2016, la primera tablilla positiva en Benalmádena fue en la semana 19, mediados de mayo. El primer pico de densidad de huevos fue en la semana 28, en el mes de julio y el segundo pico más abundante de huevos fue en la semana 39, a finales del mes de septiembre, coincidiendo con un elevado porcentaje de muestras positivas (>80%) y que sugiere un el periodo de máxima difusión del mosquito en agosto. La última tablilla positiva se recogió en la primera semana de diciembre (semana 49), con 14 huevos.

Se encontró correlación exponencial positiva entre el porcentaje de positivos y el promedio de huevos con $R^2=0,9137$.

Figura 23. Abundancia de huevos de *Ae. albopictus* por trampa y porcentaje de muestras positivas registradas en 2016 en Alhaurín de la Torre



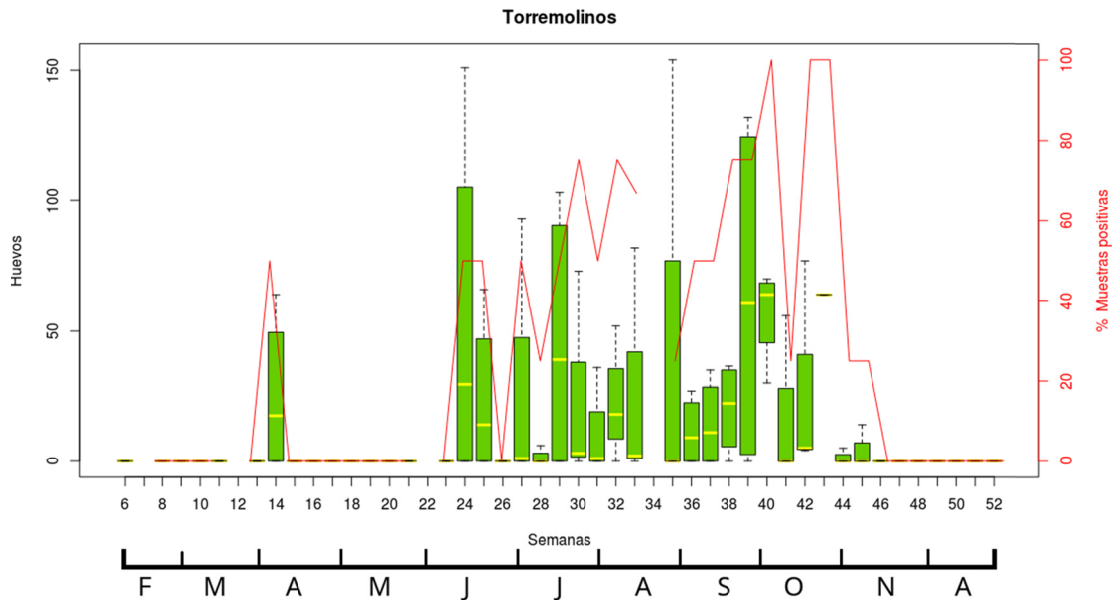
Por otro lado, en la Figura 23 se muestra la dinámica del mosquito tigre en Alhaurín de la Torre. Se aprecia que las primeras puestas en 2016 se observaron en la semana 16, en el mes de abril, y el 40% de las muestras fueron positivas. La abundancia de huevos fue oscilando y se registraron las mayores densidades de huevos en las semanas 26, 29 y 37, correspondientes a los meses julio y septiembre. El porcentaje de muestras positivas se mantuvo elevado a lo largo de todo el periodo de actividad hasta que en el mes de noviembre se produjo una brusca disminución de la densidad del mosquito, observándose la última tablilla positiva en la semana 46, a mediados de noviembre.

Se encontró correlación exponencial positiva tanto para la mediana como para la media con el porcentaje de positivos con $R^2=0,8268$ y $R^2=0,8619$ respectivamente.

En la Figura 24, se muestra la actividad en Torremolinos donde el inicio de temporada fue abril del 2016 (semana 15). Sin embargo, las semanas posteriores las muestras fueron negativas hasta que de nuevo en la semana 24, en el mes de junio, se registró un primer pico de actividad. La dinámica de densidad de huevos no mostró picos importantes, aunque sí que se observó una tendencia ascendente hasta alcanzar los máximos en el mes de septiembre (semana 38), coincidiendo con el máximo de muestras positivas. Posteriormente, la abundancia fue disminuyendo, registrándose las últimas tablillas positivas en la semana 46, en noviembre. Hay que destacar que el alto porcentaje de muestras

positivas en la semana 43 es un artefacto del muestreo pues se perdieron tres de las cuatro trampas y la única tablilla encontrada fue positiva, de ahí que salga un 100% de positivos. Lo esperable hubiera sido un porcentaje menor.

Figura 24. Abundancia de huevos de *Ae. albopictus* por trampa y porcentaje de muestras positivas registradas en 2016 en Torremolinos



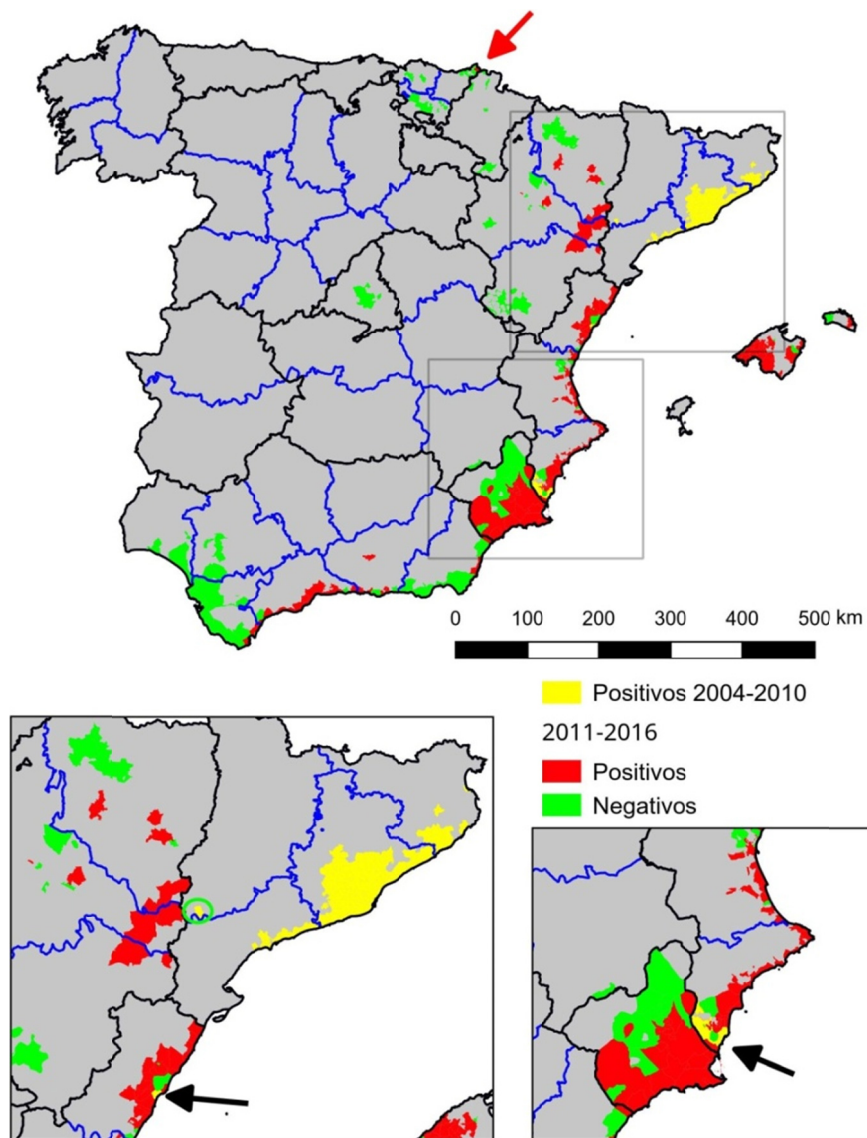
Se encontró correlación exponencial positiva entre el porcentaje de positivos y el promedio de huevos con $R^2= 0,8367$.

I.3.2. Distribución espacial

I.3.2.1. Distribución a nivel nacional

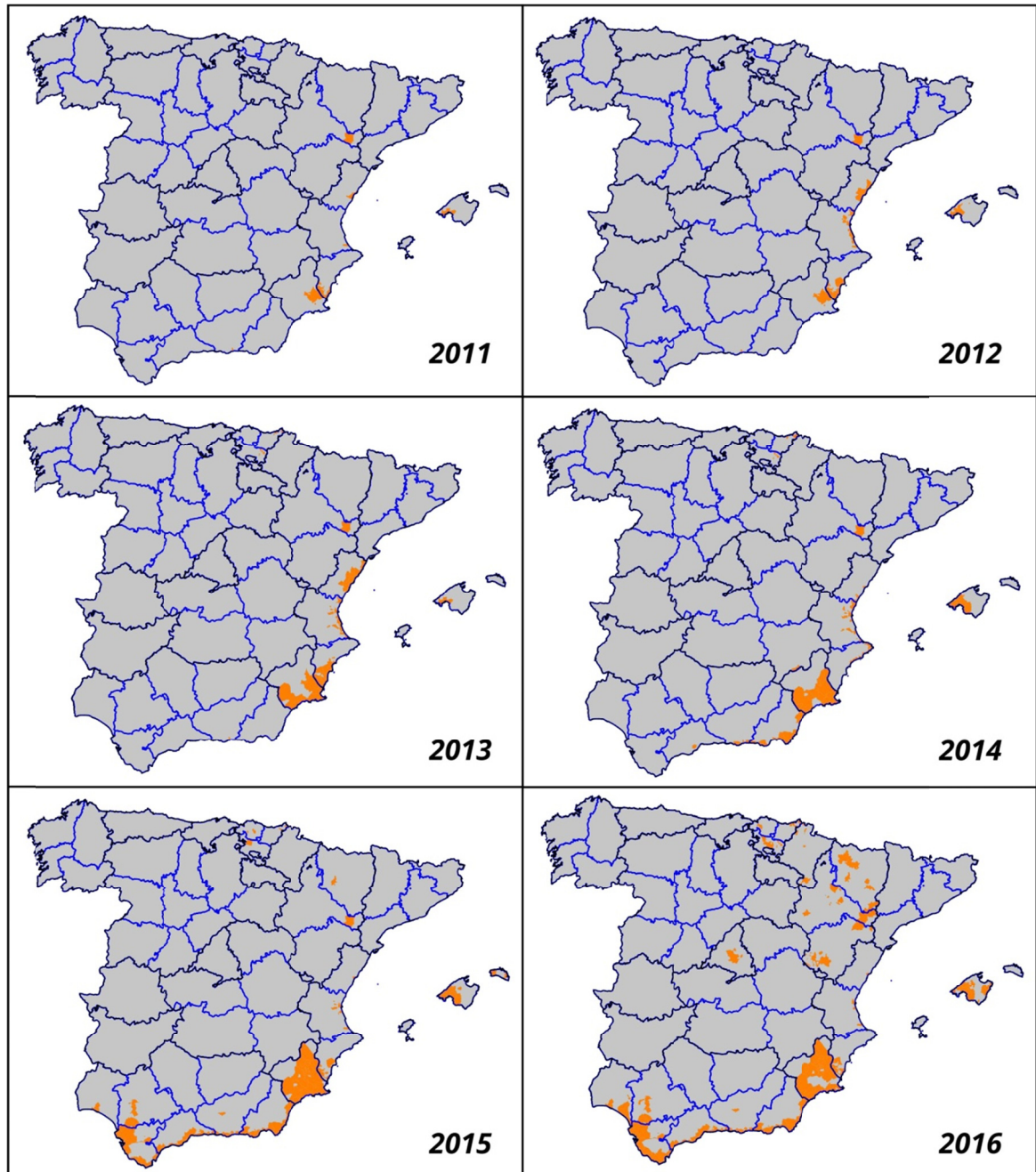
Como se puede ver en la Figura 25, 150 de los 280 municipios estudiados en el periodo 2011-2016 fueron positivos en algún momento. Se comprobó así que *Ae. albopictus* estaba presente en seis de las ocho comunidades muestreadas. En el 16,1% de las 39.602 tablillas examinadas a lo largo de los 6 años de trabajo se contabilizaron huevos de mosquito tigre.

Figura 25. Municipios detectados positivos y negativos en el periodo 2011-2016 (rojo/verde). Positivos anteriores a este trabajo, 2004-2010 (amarillo)



Como muestra la Figura 26, en el transcurso de los años de estudio, se incrementó en número de municipios y provincias estudiados, quedando reflejado el aumento de lugares positivos año tras año.

Figura 26. Municipios estudiados en este trabajo cada año en el periodo 2011-2016.



Como muestra la Tabla 3, en los trabajos de 2011, se colocaron trampas en diez municipios de la Comunidad Valenciana, Baleares y Murcia. Se detectó actividad de mosquito tigre en cuatro nuevos municipios respecto a los conocidos en años anteriores confirmando así que la especie se estaba dispersando.

Tabla 3. Resultados por años de los municipios estudiados y los positivos en cada Comunidad Autónoma

TM (total municipios muestreados); NM (nuevos municipios detectados)

CCAA	Com. Valenciana		Baleares		Murcia		Andalucía		P. Vasco		Aragón		Madrid		Castilla la Mancha		
	TM	NM	TM	NM	TM	NM	TM	NM	TM	NM	TM	NM	TM	NM	TM	NM	
2011	7	3	1	0	2	1											
2012	32	9	6	5	2	1											
2013	62	29	1	0	13	3			4	0							
2014	33	18	17	6	25	8	14	5	5	1					1	0	
2015	10	3	19	6	33	4	63	15	6	0	1	1					
2016	10	1	26	10	30	7	69	6	12	0	22	9	2	0			
2011-2016	90	63	30	27	39	24	71	26	12	1	22	9	2	0	1	0	

En 2012, se trabajó en las mismas comunidades autónomas pero con un incremento del total de municipios y trampas lo que permitió determinar que 22 de los 40 municipios eran positivos, siendo el 38% de éstos nuevas detecciones respecto al año anterior, añadiendo Baleares a la lista de comunidades afectadas por *Ae. albopictus* (Figura 27).

En 2013, se duplicó en número de localidades estudiadas y se confirmó la rápida expansión geográfica experimentada por este mosquito ya que se obtuvieron positivos en 49 de los 80 municipios, considerándose nuevos positivos el 40% del total muestreado. La gran mayoría eran municipios valencianos debido a que el mayor esfuerzo de muestreo tuvo lugar en las tres provincias de esta comunidad, debido al riesgo de expansión desde zonas previamente positivas (Tabla 3). En este año, Valencia fue positiva por primera vez.

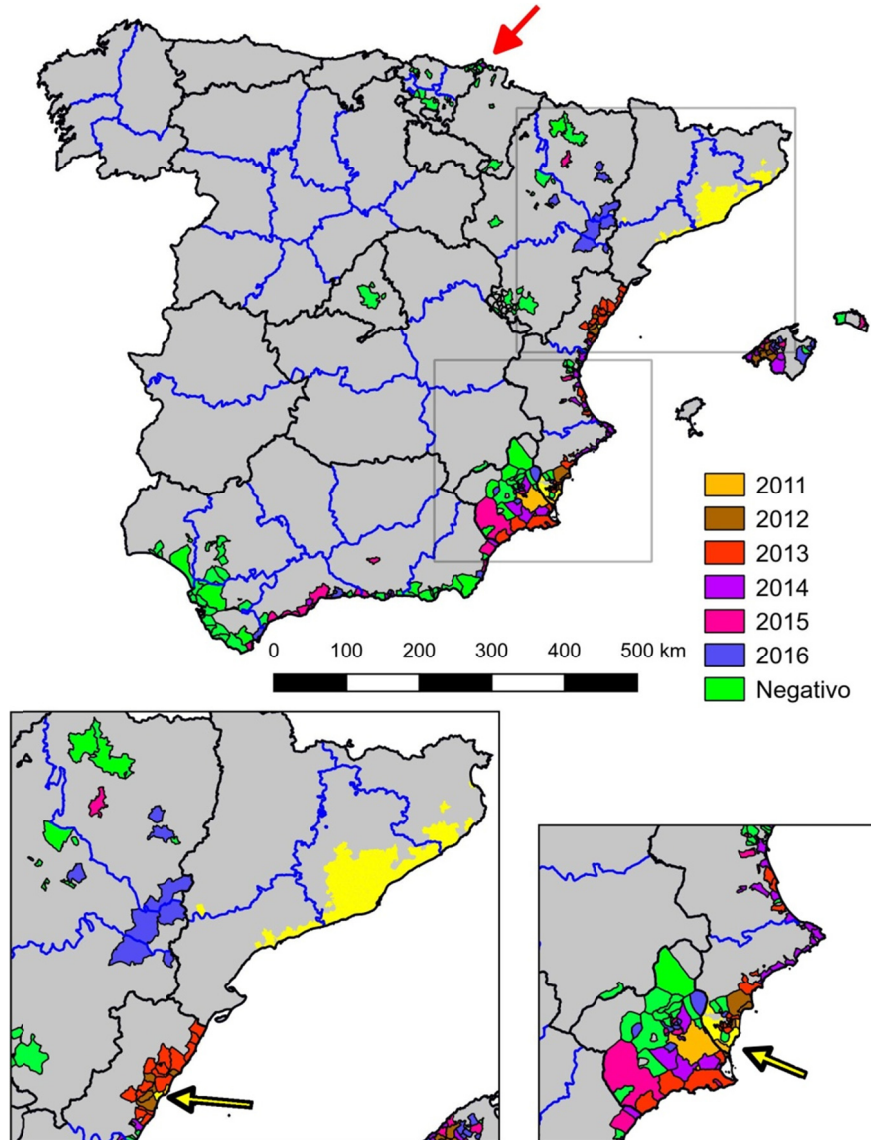
En 2014, se consideró de interés conocer la situación en Andalucía y Castilla la Mancha, dada la proximidad con Murcia, dónde se había podido comprobar que *Ae. albopictus* se encontraba establecido y en plena expansión. Por lo tanto los 95 municipios en los que se trabajó estaban repartidos en seis comunidades, abarcando de esta manera mayor territorio. Se pudo, así, confirmar el establecimiento de la especie en 14 municipios y se detectó por primera vez su presencia en 38 nuevas localidades (40% del total). Destacando las primeras detecciones de *Ae. albopictus* en el País Vasco (Guipúzcoa) y Andalucía (Almería, Granada y Málaga). En el caso de esta comunidad, como se ha indicado la primera detección se produjo en Alhaurín de la Torre, en un muestreo de urgencia surgido a raíz de los indicios en AtrapaelTigre (Delacour y cols. 2014).

En 2015, se decidió aumentar el área de estudio en las zonas de posible ampliación de rangos, por lo tanto, se intensificó el trabajo en Andalucía, Murcia y País Vasco. Así, el 21,96% de los municipios (29/132) fueron nuevos respecto al año anterior y se

detectó por primera vez mosquito tigre en Aragón (Huesca). Este caso también fue originado por los datos de AtrapaelTigre (Delacour y cols., 2015).

Por último, en 2016, el 18,75% (33/176) de municipios positivos fueron nuevas detecciones, siendo destacable la expansión por las tres provincias aragonesas.

Figura 27. Año de primera detección en municipios estudiados en este trabajo. Positivos anteriores a este trabajo, 2004-2010 (amarillo)



Al final del periodo de estudio (2011-2016), el 53,57% (150/280) del total de municipios muestreados fueron considerados como positivos a la presencia del mosquito tigre.

Se registró, por tanto, que en seis de las ocho comunidades estudiadas había poblaciones activas de *Ae. albopictus* en proceso de expansión, inicialmente por el arco mediterráneo e invadiendo progresivamente el territorio hacia el interior y por el norte de España, posiblemente desde Francia.

I.3.2.2. Resultados por Comunidades Autónomas

Dado que la intensidad de los muestreos así como la disposición de las trampas fue variable en el tiempo, a continuación se detallará por Comunidades Autónomas los resultados obtenidos.

I.3.2.2.1. Comunidad Valenciana

Como se puede ver en la Figura 28A., al final del periodo de estudio (2011-2016), el 73,33% (66/90) de los municipios muestreados fueron positivos.

La presencia de *Ae. albopictus* en la Comunidad Valenciana ocurrió en 2005, al detectarse ejemplares en la costa de Orihuela (Alicante)(Roiz y cols., 2007). Este era el primer punto positivo fuera de Cataluña y muy alejada de la zona conocida hasta ese momento. A partir de 2009, comenzó a encontrarse en más localidades (Delacour y cols., 2009). Se constató la rápida dispersión de la especie tras encontrar en 2010, ejemplares en la provincia de Castellón, concretamente en Benicassim. Por tanto, el objetivo inicial de este estudio fue determinar la situación de mosquito tigre en los municipios considerados positivos en años anteriores, así como en sus áreas de influencia.

En la Figura 28B aparece la secuencia temporal de nuevas detecciones del muestreo como detallamos a continuación.

Así, en 2011 se trabajó en siete municipios, seis de ellos fueron positivos, siendo tres nuevas detecciones; Guardamar del Segura y Pilar de la Horadada (Alicante) y Oropesa (Castellón).

En 2012, se repartieron 715 trampas en 32 localidades de las tres provincias, incluyendo Valencia por primera vez. El 46,87% de los municipios fueron positivos siendo nueve de éstos nuevas detecciones, cuatro en Alicante y cinco en Castellón. Siempre municipios colindantes con otros ya considerados positivos, confirmando así la difusión progresiva del mosquito tigre.

En 2013, el vector mostró una dispersión por la provincia de Castellón con 15 nuevos municipios positivos. La mitad sur de los municipios costeros de Alicante fueron estudiados y 11 resultaron positivos. Ese año, se produjo la primera detección en la provincia de Valencia en tres localidades alejadas de municipios positivos conocidos hasta la fecha, sugiriendo de nuevo la dispersión por transporte pasivo en algún tipo de vehículo. Bueno-Marí y cols., (2013) también lo hallaron, este año, en esta provincia. Así, el 22,37% de las tablillas estudiadas en 2013 contenían huevos, confirmando actividad del mosquito en el 53,07% de los puntos seleccionados para el trabajo.

En 2014, hubo un cambio de estrategia de trabajo pues se consideró que el mosquito estaba establecido en aquellos municipios considerados positivos durante varios años. Por tanto, éstos positivos se dejaron de muestrear con el fin emplear los limitados recursos en abarcar mayor territorio y conocer, así, la situación en localidades nunca

antes muestreadas. Se trabajó con mayor intensidad en la provincia de Valencia, y se pudo confirmar ocho nuevos municipios positivos. En Alicante, continuó la expansión y se registraron principalmente hacia el norte de la provincia, nueve nuevos municipios conectados por carretera con Valencia y cerrando así el corredor mediterráneo junto con el nuevo municipio detectado al sur de la provincia de Castellón. En 2014 el 57,04% de los puntos repartidos en 33 municipios fueron positivos.

Figura 28. A. Positivos detectados y negativos en la Comunidad Valenciana; B. Año de primera detección en municipios de la Comunidad Valenciana estudiados en este trabajo (2011-2016). Positivos anteriores a este trabajo, 2004-2010 (amarillo)

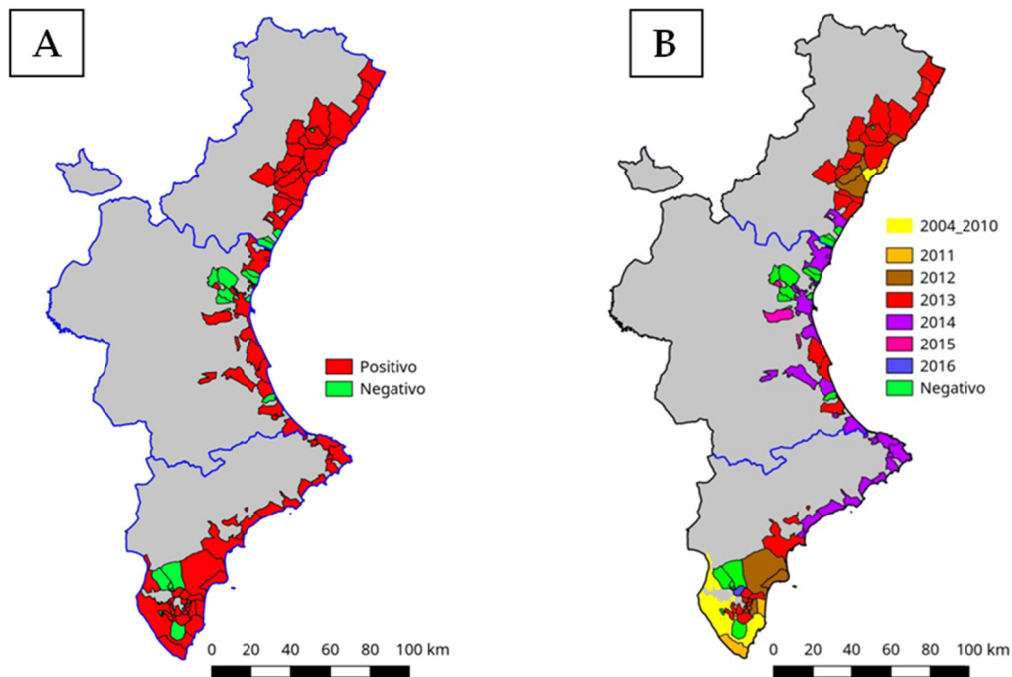


Tabla 4. Datos de municipios y puntos totales muestreados a lo largo del periodo de estudio en la Comunidad Valenciana

Comunidad Valenciana	municipios			puntos	
	totales	total positivos	nuevos positivos	totales	% positivos
2011	7	6	3	48	70,83
2012	32	15	9	93	37,63
2013	62	42	29	181	53,04
2014	33	21	18	95	54,74
2015	10	8	3	55	72,73
2016	10	8	1	67	40,30
2011-2016	90	66	63		

A partir de 2015, los esfuerzos de muestreo en esta comunidad se redujeron para redirigirlos a la vigilancia en otras provincias (Tabla 4). A pesar de ello, en 2015 se detectaron tres nuevos municipios positivos en la provincia de Valencia, con un 72,73% de los puntos positivos. En 2016, el 40,3% de los puntos fueron positivos, repartidos en ocho municipios, siendo uno de ellos nuevo positivo en la provincia de Alicante. Se

confirmaba así el establecimiento de la especie en el 72,22% de los municipios en los que se trabajó en la Comunidad Valenciana.

Tabla 5. Datos de número de trampas y municipios estudiados en cada provincia durante el periodo de trabajo en la Comunidad Valenciana

MPositivos (Municipios positivos)

Comunidad Valenciana	Castellón		Valencia		Alicante		tablillas	
	MPositivos/ Totales	trampas	MPositivos/ Totales	trampas	MPositivos/ Totales	trampas	totales	% pos.
2011	2/3	110	0	0	4/4	170	958	20,67
2012	7/12	255	0/10	290	8/10	170	2510	5,62
2013	21/23	316	3/15	260	18/24	305	1913	22,37
2014	1/5	33	9/18	143	10/10	119	1035	19,13
2015	1/1	9	5/6	68	2/3	50	438	40,41
2016	1/1	9	2/2	18	5/7	116	1050	23,14
2011-2016	29	732	27	779	34	930	7904	17,52

I.3.2.2.2. Islas Baleares

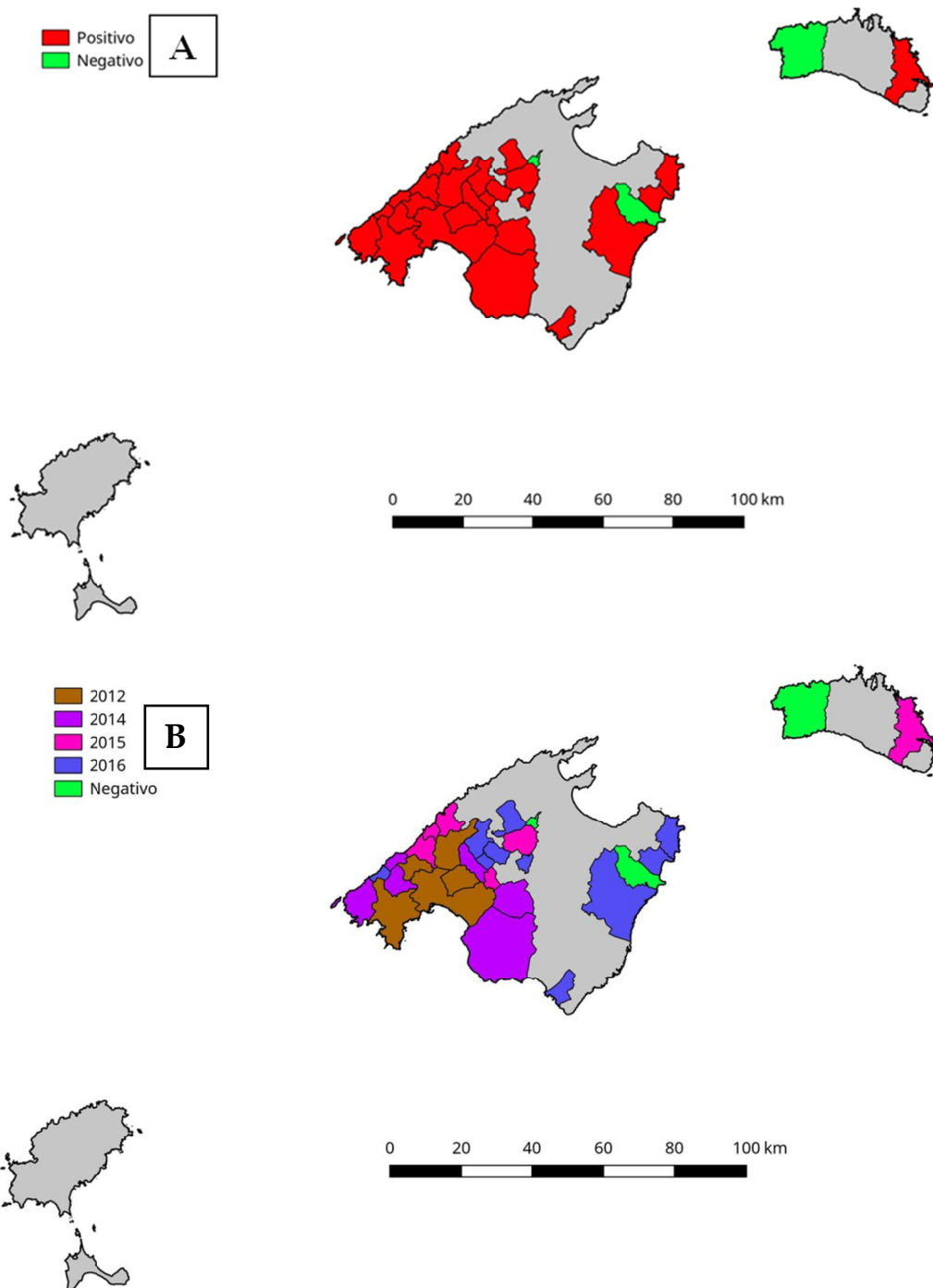
Los primeros muestreos llevados a cabo en las Islas Baleares fueron en la Base aérea de Son Sant Joan y en el puerto de Palma de Mallorca con resultados negativos. Sin embargo, a partir de 2012, se incrementó el número de municipios muestreados y, como se puede ver en la Figura 29A., al final del periodo de estudio (2011-2016), se confirmó la presencia de *Ae. albopictus* en el archipiélago, detectándose principalmente en la isla de Mallorca y, en menor medida, en Menorca, donde no se pudo trabajar de manera continuada por diversos aspectos. Concretamente, en el 90% de los municipios muestreados se contabilizaron huevos en las trampas. Se trabajó en 28 localidades de la isla de Mallorca y dos de Menorca. El aumento de tablillas positivas observado a lo largo del periodo de estudio, podría deberse a un incremento de las densidades poblacionales de mosquito tigre que habrían favorecido la rápida dispersión por las islas Baleares.

En 2012, tras las quejas de los ciudadanos se realizó un muestreo intensivo y se colocaron trampas en 202 puntos repartidos en seis municipios. El 34,65% de éstos, seleccionados en los municipios de Calvià, Palma, Bunyola, Esporles y Marratxí, fueron positivos, confirmando la presencia de *Ae. albopictus* por primera vez en la isla de Mallorca (Mikel y cols., 2013).

En 2013, solo se trabajó en el puerto y aeropuerto de Palma confirmando el establecimiento de la especie en el municipio.

A partir del año 2014, con la ayuda de varias colaboraciones, se pudo aumentar el número de municipios estudiados a 17. Considerando el entorno se eligieron 269 puntos para la colocación de trampas (298). Se detectó la presencia de mosquito tigre en el 31,23% de los puntos muestreados, correspondiente a 12 municipios, siendo seis de ellos nuevas detecciones.

Figura 29. A. Positivos detectados y negativos en las Islas Baleares; B. Año de primera detección en municipios baleares estudiados en este trabajo



La dispersión de la especie se hizo particularmente notable a partir de 2015 cuando se registró que el 82,68% de los puntos con trampas eran positivos, correspondiente a 17 de los 19 municipios estudiados. Lo destacable fue la detección en Mahón (Menorca) por primera vez, confirmando la dispersión entre islas.

Finalmente en 2016, 10 municipios más pasaron a ser positivos tras contabilizarse huevos en el 46,91% de las tablillas examinadas.

Tabla 6. Datos de municipios y puntos totales muestreados a lo largo del periodo de estudio en las Islas Baleares

Baleares	municipios			puntos	
	totales	total positivos	nuevos positivos	totales	% positivos
2011	1	0	0	2	0,00
2012	6	5	5	202	34,65
2013	1	1	0	2	50,00
2014	17	12	6	269	31,23
2015	19	17	6	254	82,68
2016	26	25	10	226	84,96
2011-2016	30	27	27		

Tabla 7. Datos de número de trampas y municipios estudiados en cada provincia durante el periodo de trabajo en las Islas Baleares

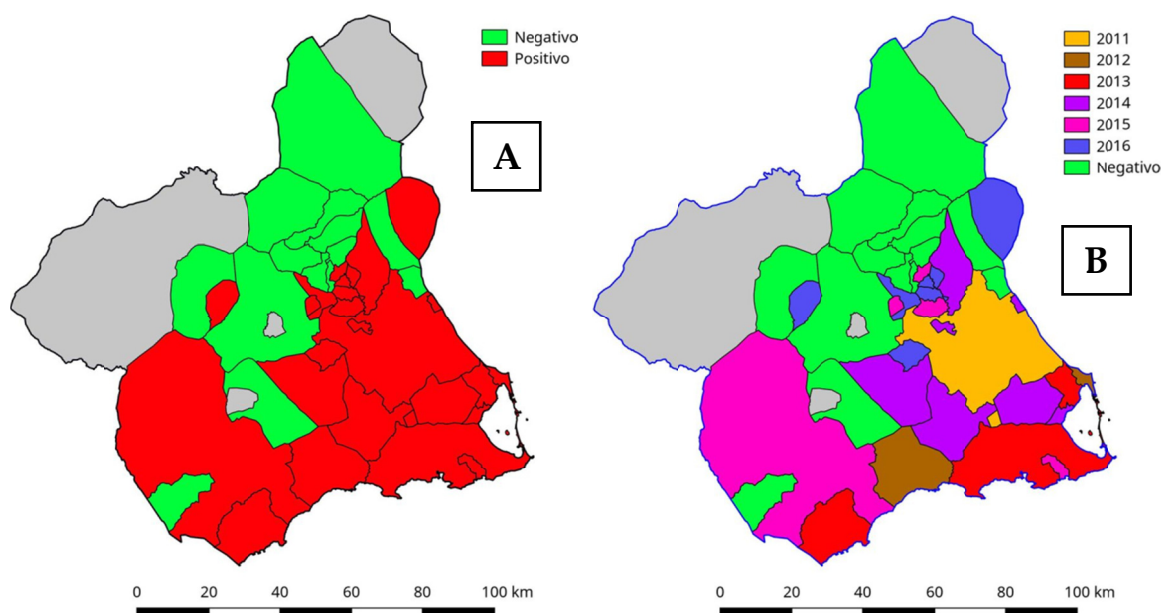
NM (No Muestreado)

Baleares	Mallorca		Menorca		tablillas	
	municipios	trampas	municipios	trampas	totales	% positivas
2011	1	16	NM		64	0,00
2012	6	202	NM		710	NC
2013	1	40	NM		199	0,50
2014	17	298	NM		2877	11,82
2015	17	265	2	10	2663	40,71
2016	26	235	NM		2543	46,91
2011-2016	29	1056	2	10	9056	28,91

I.3.2.2.3. Región de Murcia

Como se puede ver en la Figura 30A., al final del periodo de estudio (2011-2016), se confirmó la presencia de *Ae. albopictus* en el 64,1% (25/39) de los municipios muestreados, que comprenden casi todos los de la mitad sur de la comunidad.

Figura 30. A. Positivos detectados y negativos en la Región de Murcia; B. Año de primera detección en municipios murcianos estudiados en este trabajo



Aedes albopictus fue detectado por primera vez en forma de adulto en la Era Alta, una pedanía perteneciente al municipio de Murcia en 2011 (Collantes y Delgado, 2011). Sin embargo, San Pedro del Pinatar, el primer municipio murciano fronterizo con la provincia de Alicante, fue negativo ese mismo año, reforzando la idea de que la dispersión del mosquito tigre también ocurría mediante saltos de dispersión.

Un año más tarde, en 2012 se confirmó la presencia de huevos en dos tablillas de las 29 colocadas en San Pedro del Pinatar por lo que la difusión de este vector desde la provincia de Alicante también se produjo de manera progresiva. El 16,28% de las tablillas fueron positivas correspondiendo al 44,12% de los puntos repartidos en las dos localidades en los que se trabajó. La mayoría de las trampas se colocaron en el municipio de Murcia debido a su gran extensión. De esta manera se pudo determinar el grado de dispersión de la especie desde la Era Alta.

A partir de 2013, se incrementó el esfuerzo de muestreo, seleccionando seleccionando 296 puntos para la colocación de trampas (329), repartidas en 13 municipios. Se detectaron tres nuevos municipios respecto al año anterior, siendo el 25,23% de los puntos positivos.

En 2014, se trabajó en 13 nuevos municipios colocando 589 trampas repartidas en 492 puntos. El 52% de los municipios fueron positivos, siendo ocho de ellos nuevas detecciones. El 33,13% de los puntos fueron positivos.

En 2015, algunos de los municipios estudiados en años anteriores y considerados positivos se eliminaron del muestreo y se añadieron 11 nuevos. Así, se colocaron 341 trampas en un total de 33 municipios. El 39,39% fueron positivos, siendo cuatro de ellos nuevas detecciones en la comunidad.

Finalmente, en 2016, se trabajó en 30 municipios, dos de ellos por primera vez. El 50% de las localidades fueron positivas, registrándose huevos por primera vez en siete municipios y confirmándose la dispersión y establecimiento de la especie por la comunidad.

Tabla 8. Datos de municipios y puntos totales muestreados a lo largo del periodo de estudio en la Región de Murcia

Murcia	municipios			puntos	
	totales	total positivos	nuevos positivos	totales	% pos
2011	2	1	1	4	25,00
2012	2	2	1	34	44,12
2013	13	6	3	329	25,23
2014	25	13	8	492	33,13
2015	33	13	4	263	31,94
2016	30	15	7	222	35,14
2011-2016	39	25	24		

Tabla 9. Datos de número de trampas y municipios estudiados durante el periodo de trabajo en la Región de Murcia

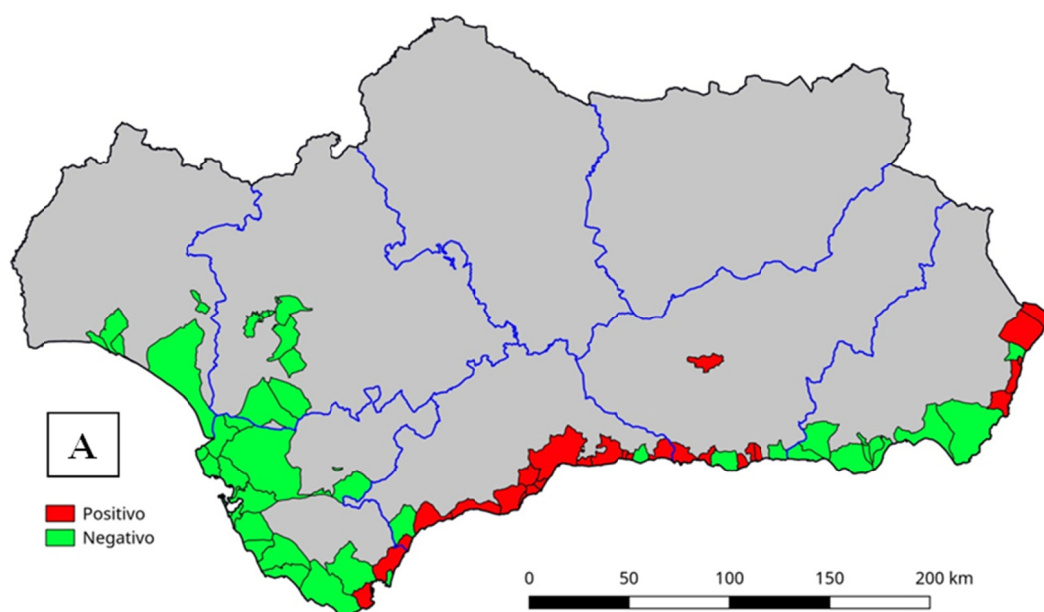
Murcia	municipios	trampas	tablillas totales	% tablillas positivas
2011	2	15	51	0,00
2012	2	44	129	16,28
2013	13	296	732	13,11
2014	25	589	4153	15,36
2015	33	341	2944	12,13
2016	30	438	3160	20,13
2011-2016	39	1723	11169	15,65

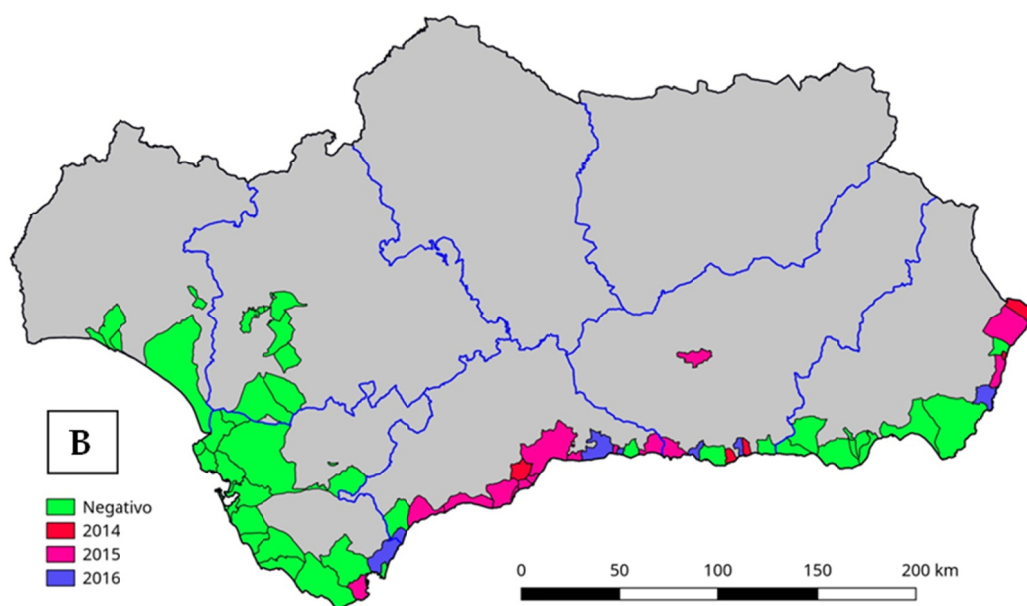
I.3.2.2.4. Andalucía

Los resultados obtenidos en los muestreos de otras comunidades en el periodo comprendido entre 2011 y 2013, sugirieron que *Ae. albopictus* se estaba dispersando a una velocidad mayor de la esperada y abarcando mucho más territorio. Se decidió por tanto iniciar en 2014 la vigilancia en Andalucía.

La primera detección fue fruto de los avisos de la plataforma AtrapaelTigre, por lo que se realizó un muestreo de urgencia, a finales de julio/principios de agosto de 2014 en Alhaurín de la Torre (Málaga), confirmándose así su presencia (Delacour y cols., 2015). En cuanto a la planificación del muestreo, se trabajó principalmente en la provincia de Almería, donde se colocaron 103 trampas en nueve municipios. También se inició la vigilancia en cuatro municipios de Granada con la colocación de 36 trampas. Así, como se puede apreciar en la Figura 31B., se detectaron cinco nuevos municipios, dos en Almería, dos más en Granada y uno en Málaga. Este hecho confirmaba una vez más, que *Ae. albopictus* ya estaba más ampliamente distribuida de lo que se pensaba.

Figura 31. A. Positivos detectados y negativos en Andalucía; B. Año de primera detección en municipios andaluces estudiados en este trabajo





Como se observa en la Tabla 10, al final del periodo 2014-2016, se trabajó en 71 municipios, siendo 26 de ellos positivos a la presencia de *Ae. albopictus* (Figura 31A). Al final del periodo de trabajo, 2014-2016, se ha detectado en todas las provincias andaluzas de la costa mediterránea (Figura 31B).

Tabla 10. Datos de municipios y puntos totales muestreados a lo largo del periodo de estudio en Andalucía

Andalucía	municipios			puntos	
	totales	total positivos	nuevos positivos	totales	% pos
2014	14	5	5	67	17,91
2015	63	19	15	204	19,12
2016	69	24	6	296	25,34
2014-2016	71	26	26		

En 2015, se añadieron tres provincias más a la vigilancia, aumentando a 63 el total de municipios muestreados. El 30,15% de los municipios fueron positivos, siendo 15 de ellos nuevas detecciones, principalmente en la provincia de Málaga y, por primera vez, en la provincia de Cádiz. Hay que destacar que el plan de muestreo, dedicado casi exclusivamente a municipios costeros, incluyó el municipio de Granada capital por indicios de la presencia de mosquito tigre, donde fue capturado en 2015.

Finalmente en 2016, se trabajó en 69 municipios y 24 de ellos fueron positivos, seis más que el año anterior. En el 25,34% de los puntos se registró actividad reproductora del mosquito tigre.

Tabla 11. Datos de número de trampas y municipios estudiados en cada provincia durante el periodo de trabajo en Andalucía

NM (No Muestreado); MPositivos (Municipios Positivos)

Andalucía		2014	2015	2016	2014-2016
Almería	MPositivos/Totales trampas	2/9	4/14	5/14	13
		103	70	86	259
Granada	MPositivos/Totales trampas	2/4	3/8	5/8	8
		36	78	84	198
Málaga	MPositivos/Totales trampas	1/1	11/15	12/15	15
		10	115	129	254
Cádiz	MPositivos/Totales trampas	NM	1/16	2/18	18
			114	134	248
Sevilla	MPositivos/Totales trampas	NM	0/7	0/8	9
			34	37	71
Huelva	MPositivos/Totales trampas	NM	0/3	0/6	7
			6	13	19
tablillas	totales	494	1002	1680	3176
	% positivas	3,24	10,18	22,26	15,49

Cabe destacar que la localidad de Polopos en Granada, fue positiva en 2014 pero no se contabilizaron huevos en las trampas en los dos años posteriores de muestreo. De igual manera, el municipio de El Algarrobo, en Málaga, fue positivo en 2015 y negativo en 2016. Por tanto, es posible que la especie se transportada de manera pasiva pero no llegase a establecerse.

I.3.2.2.5. País Vasco

La vigilancia en el País Vasco se inició en 2013 pero los resultados fueron negativos hasta que, en 2014, se contabilizaron huevos en dos tablillas correspondientes a un único punto del municipio de Irún (Guipúzcoa) (Tabla 12). Al final del periodo 2013-2016, se trabajó en 16 municipios repartidos en las tres provincias pero no se detectó dispersión de la especie por la localidad ni municipios colindantes (Figura 32). Se pudo confirmar que la especie estaba establecida en el municipio pero como muestra la tabla 13 el número de tablillas positivas no fue muy elevado, lo que sugiere que el mosquito no alcanzaba densidades importantes, hecho que junto a los tratamientos puntuales realizados, probablemente limitó su dispersión.

Tabla 12. Datos de municipios y puntos totales muestreados a lo largo del periodo de estudio en el País Vasco

País Vasco	municipios			puntos	
	totales	total positivos	nuevos positivos	totales	% pos
2013	4	0	0	4	0,00
2014	5	1	1	10	10,00
2015	6	1	0	11	18,18
2016	12	1	0	21	9,52
2013-2016	16	1	1		

Figura 32. Positivos detectados y negativos en el País Vasco

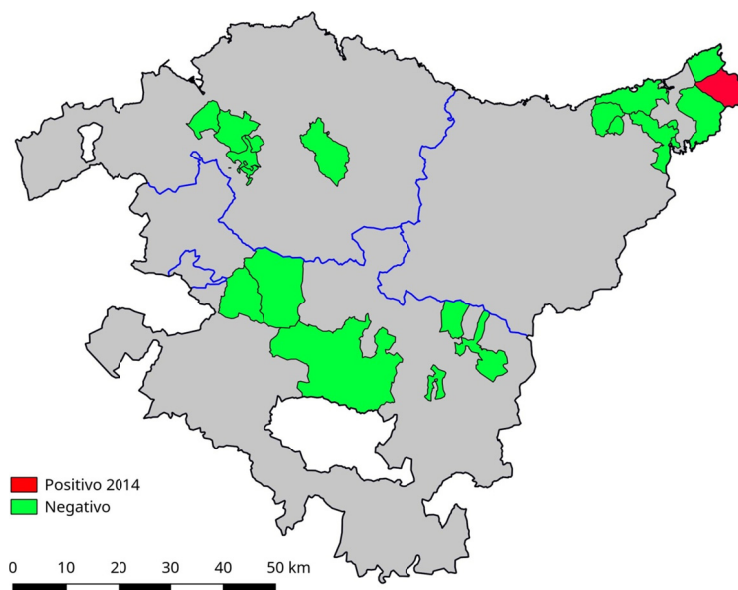


Tabla 13. Datos de número de trampas y municipios estudiados en cada provincia durante el periodo de trabajo en el País Vasco

País Vasco	Álava		Guipúzcoa		Vizcaya		tablillas	
	municipios	trampas	municipios	trampas	municipios	trampas	totales	% pos
2013	1	10	3	28	NM		410	0,00
2014	1	10	4	60	NM		630	0,32
2015	2	8	1	48	3	16	768	1,95
2016	3	40	4	110	5	50	3301	0,15
2013-2016	4	68	6	246	6	66	5109	0,43

I.3.2.2.6. Aragón

Tras el aviso de un ciudadano, mediante la aplicación de móvil AtrapaelTigre, en septiembre de 2015, se realizó el primer muestreo de *Ae. albopictus* en la Comunidad Autónoma de Aragón. Se pudo confirmar, tras cuatro semanas de muestreo y el estudio de 29 tablillas, que la especie estaba presente por primera vez en la provincia de Huesca (Delacour y cols., 2016).

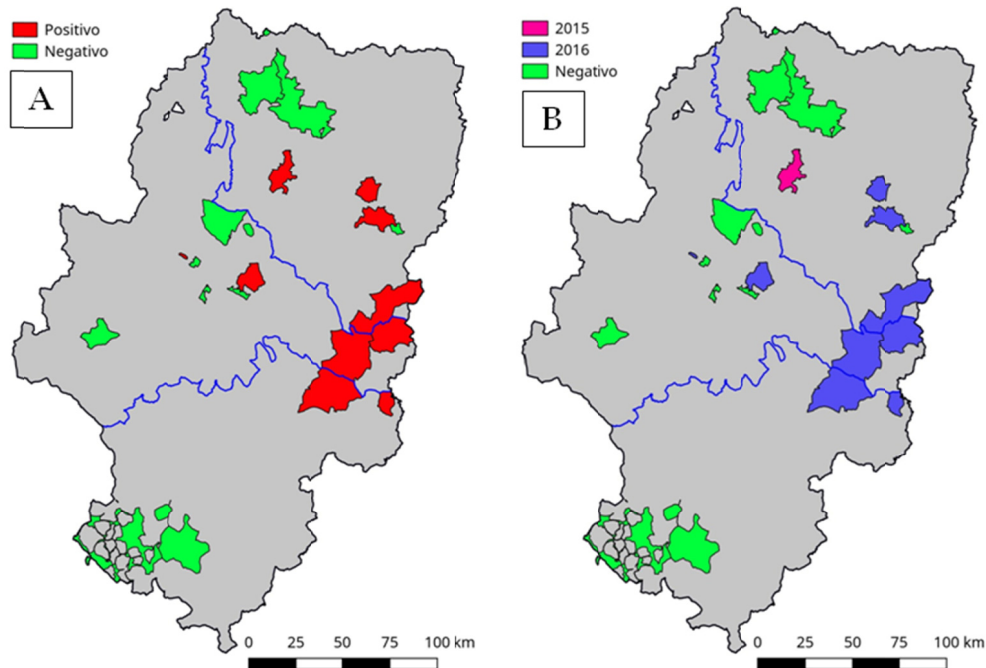
Tabla 14. Datos de municipios y puntos totales muestreados a lo largo del periodo de estudio en Aragón

Aragón	municipios			puntos	
	totales	total positivos	nuevos positivos	totales	% pos
2015	1	1	1	1	100,00
2016	22	9	9	113	21,24
2015-2016	22	10	10	114	21,93

Tabla 15. Datos de número de trampas y municipios estudiados en cada provincia durante el periodo de trabajo en Aragón

Aragón	Huesca		Zaragoza		Teruel		tablillas	
	Mpositivos/ Totales	trampas	Mpositivos/ Totales	trampas	Mpositivos/ Totales	trampas	totales	% pos.
2015	1/1	10					29	16,67
2016	3/7	89	4/10	87	2/5	45	2374	3,83
2015-2016	4	99	4	87	2	45	2404	4,03

Figura 33. A. Positivos detectados y negativos en Aragón; B. Año de primera detección en municipios aragoneses estudiados en este trabajo



Como se puede ver en la Tabla 14, en 2016, se inició un plan de vigilancia en las tres provincias y se trabajó en 22 municipios, nueve de los cuales fueron positivos por primera vez, añadiendo así Teruel y Zaragoza a la lista de provincias afectadas por mosquito tigre (Figura 33A).

Cabe destacar que en ninguna de las 16 trampas repartidas por la ciudad de Huesca en 2016 se contabilizaron huevos de mosquito tigre (Tabla 15) y, por lo tanto, sugiere que la población detectada anteriormente no llegó a establecerse o estaba muy localizada y fue eliminada mediante las intervenciones que se realizaron inmeditamente.

I.3.2.2.7. Otras comunidades

A lo largo de los seis años de trabajo de campo, se ha realizado estudios de menor extensión o puntuales en otras provincias. En 2014, tras recibir el aviso por parte de un ciudadano residente en Murcia pero destinado en el municipio de Socovos (Albacete), se realizó un muestreo mediante la colocación de 10 trampas en dicho municipio. No se contabilizaron huevos en ninguna de las 88 tablillas que se recogieron del estudio.

Por otro lado, en Madrid, englobado en el plan nacional de vigilancia entomológica en puertos y aeropuertos, se colocaron cuatro trampas en el aeropuerto Madrid Barajas y cuatro en la Base aérea de Torrejón, con resultados negativos en las 88 tablillas estudiadas.

I.3.3. Publicaciones derivadas de este apartado

Dado que este es el apartado más desarrollado del trabajo de tesis, gran parte de sus resultados han sido ya publicados por nuestro grupo y colaboradores en distintas revistas científicas:

- Delacour-Estrella y cols. (2010). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*.
- Alarcón-Elbal y cols. (2013). *Anales de Biología*.
- Alarcón-Elbal y cols. (2014). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.
- Collantes y cols. (2014). *Anales de Biología*.
- Delacour y cols. (2015). *Anales de Biología*.
- Collantes y cols. (2015). *Parasites & Vectors*.
- Barceló y cols. (2015). *Journal of the European Mosquito Control Association*.
- Delacour-Estrella y cols. (2016). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*.
- Delacour-Estrella y cols. (2016). *Anales de Biología*.
- Bengoa y cols. (2016). *Journal of the European Mosquito Control Association*.
- Collantes y cols. (2016). *Acta Tropica*.

I.4. Discusión

Este trabajo ha permitido recopilar la evolución temporal del área de distribución de *Ae. albopictus* en España. Desde 2011, los datos insinúan una aceleración del proceso de dispersión. Pero lo que es evidente es que doce años después de su detección en la provincia de Barcelona, esta especie se encuentra presente y establecida en 17 nuevas provincias de las 23 estudiadas, incluyendo algunas del interior y sur del país, donde algunos modelos predictivos sugerían era muy improbable que la especie se estableciera (ECDC 2009, 2012, Caminade 2012, Fischer y cols., 2014; Cunze y cols., 2016).

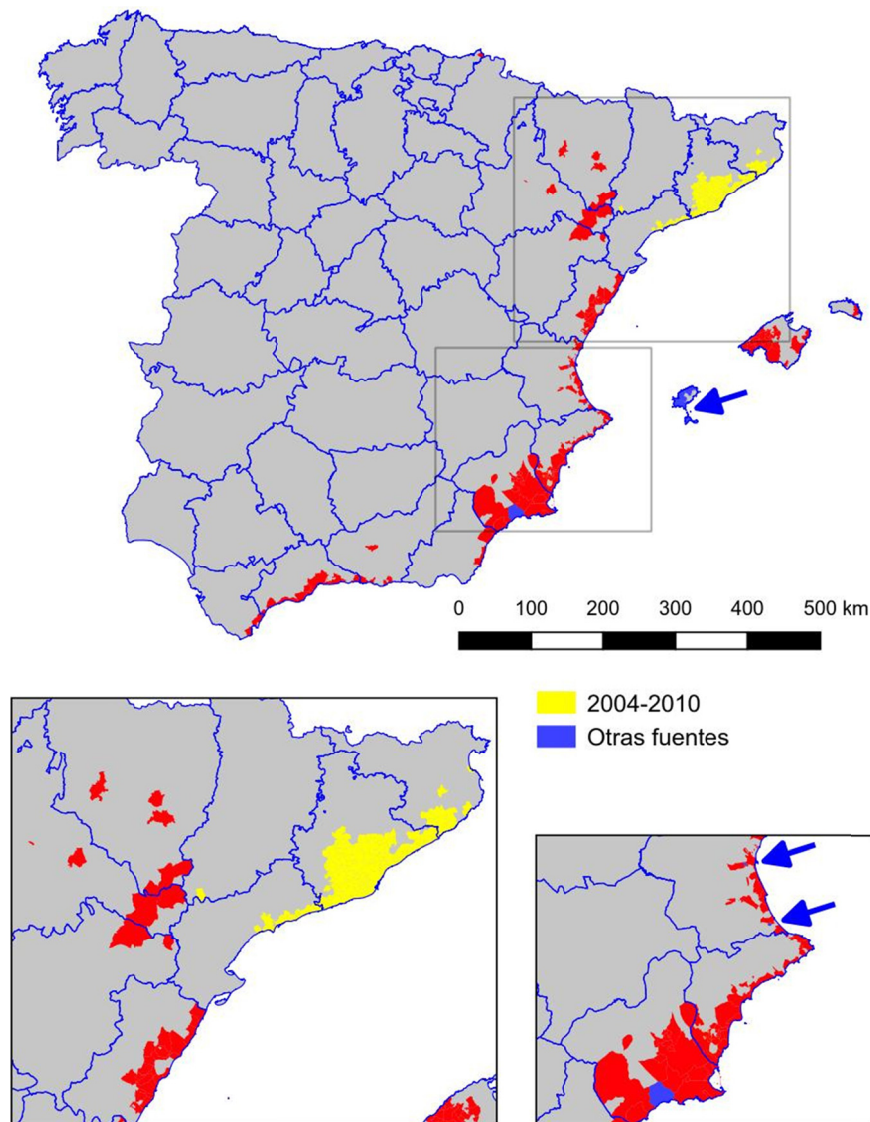
La mayoría de detecciones de *Ae. albopictus*, fuera del ámbito de Cataluña, han sido realizadas en el marco o en relación a este trabajo (Figura 34). Además, otros investigadores han realizado primeras detecciones, simultáneas o ligeramente posteriores a las nuestras:

- Cataluña: Diversos municipios en cuyo estudio intervino la Generalitat de Catalunya, DIPSALUT Girona o Mosquito Alert.
- Comunidad Valenciana: Provincia de Valencia (Bueno-Marí y cols., 2013)(simultánea); Real de Gandía (Valencia)(Bueno-Marí y cols., 2013)(primera detección; Picanya (Valencia)(Bueno-Marí y cols., 2014)(primera detección); El Campello (Alicante)(Bueno-Marí y cols., 2014)(simultánea); Valencia (Bueno-Marí & Quero de Lera, 2015)(simultánea).
- Región de Murcia: Mazarrón (Bueno-Marí y cols., 2012) (primera detección).

- Andalucía: Mojácar (Bueno-Marí & Gracia-Mújica, 2015) (simultánea).
- Baleares: Ibiza (Isla de Ibiza, Baleares) (Barceló y cols. 2015) (primera detección); Sant Antoni de Portmany, Sant Joan de Labritja, Sant Josep de sa Talaia Ibiza (Isla de Ibiza) y Formentera (Consejos Insulares de Ibiza y Formentera, Empresa TRAGSA) (Collantes y cols., 2016) (primera detección).

Algunos de estos datos, pese a no ser parte de nuestro trabajo, fueron publicados junto a nuestros resultados en publicaciones cooperativas como son Collantes y cols. (2015, 2016).

Figura 34. Municipios detectados positivos hasta 2016 (excepto Cataluña). Anteriores a este trabajo, 2004-2010 (amarillo). En el periodo de realización de este trabajo: Positivos detectados en muestreos coordinados o en relación al proyecto del ministerio (rojo) y primeros positivos detectados por otros investigadores o entidades (azul).



Como se ha detallado anteriormente en la metodología y ha quedado reflejado en los resultados presentados, la vigilancia entomológica no se realizó de manera sistemática. La falta de presupuesto para trabajar por todo el territorio nacional de forma uniforme obligó a trabajar por sectores. Los resultados obtenidos cada año fueron la base para la elaboración de los planes de trabajo de años posteriores. Por tanto, el esfuerzo de muestreo no fue uniforme ni constante en el tiempo. En la actualidad, asumimos que en los comienzos del presente trabajo, muy posiblemente, la distribución real de *Ae. albopictus* era mayor de la sospechada. Por ello, se ha optado por el empleo del término “distribución conocida” de la especie en lugar de, sencillamente, distribución. De hecho, a lo largo de los últimos años de vigilancia, se han publicado referencias de la distribución del mosquito tigre en lugares no incluidos en nuestro estudio y que por lo tanto ponen de manifiesto que la especie estaba ampliamente distribuida (Bueno-Marí y cols., 2012; 2013; 2014; Barceló y cols., 2015). Es posible que, dada su plasticidad ecológica, el mosquito tigre esté presente en otros lugares desconocidos hasta la fecha. Algunos autores sugieren que su presencia no se hace notar hasta aproximadamente dos años después de su llegada (com. pers. R. Eritja). Recientemente, el mosquito tigre ha llegado a las provincias de Madrid (Melero-Alcibar y cols., 2017), Vizcaya y Sevilla (Temporada de muestreo de 2017, datos aún no publicados), por lo que parece que su dispersión continúa, tanto por el sur como por el norte de la península.

La utilización de trampas de ovoposición es frecuente en los planes de vigilancia, dada la buena relación coste-beneficio (ECDC, 2012). Permiten por tanto muestrear mayor territorio que con trampas más costosas o complejas. A lo largo de una temporada, se puede observar como la trampa de un punto arroja resultados positivos de forma discontinua en el tiempo. En algunas ocasiones esto se puede deber a bajas densidades de mosquitos, al colocar la ovitrampa cerca de una planta repelente o a la presencia de contenedores con agua en el área de estudio. De modo que, como otros autores han señalado (Kröckel y cols., 2006; Becker y cols., 2013; Fonseca y cols., 2015), las ovitrampas puede subestimar las poblaciones de mosquito tigre. Por este motivo, a lo largo de la evolución de los planes de muestreo, pareció más eficaz concentrar trampas en menos puntos del municipio que dispersarlas a lo largo de éste (muchos puntos con una sola trampa). Pudimos observar esto, al tener dos patrones de distribución de trampas solapados en el municipio de San Pedro del Pinatar (Murcia) (Alarcón-Elbal y cols., 2014). La red de 16 puntos con trampas individuales resultó negativa mientras que dos puntos con cinco trampas cada uno fueron positivos (aunque no las mismas trampas en todas las ocasiones). Las trampas de un mismo punto, se comportan como pseudorréplicas. Pero no se trata del clásico error de muestreo señalado en ecología por Hurlbert (1984), sino que se busca a propósito esos valores repetidos para ese punto. Esta opción, reduce la posibilidad de falsos negativos y las consecuencias de la pérdida de muestras.

Sin embargo, hay que ser cuidadoso en la interpretación de los datos derivados del conteo de huevos en las trampas de ovoposición. Manica y cols. (2017) concluyen que las ovitrampas son eficaces para caracterizar un municipio como negativo o positivo

pero no hay que extrapolar los datos de cantidad de huevos a la densidad de adultos, debido a que se subestimaría la abundancia real de mosquitos. La relación entre abundancia de huevos y cantidad de hembras picadoras puede verse afectada por las condiciones climáticas (temperatura, pluviometría, viento, etc.) (Hawley, 1988; Waldock y cols., 2013; Vallorani y cols., 2015), ecológicas (presencia de lugares alternativos donde ovopositar) (Davis y cols., 2015), demográficas (densidad poblacional de humanos u hospedadores alternativos) (Manica y cols., 2017), incluso estacionales (Fonseca y cols., 2015).

De forma general, se asume que estas variables pueden ser determinantes para el establecimiento de esta especie y, es posible, que a gran escala puedan llegar a ser útiles en el diseño de modelos de riesgo sanitario y/o adecuación ambiental. Sin embargo, la realidad a escala local es muy distinta pues existe una gran cantidad de variables que, a este nivel local siguen sin estar claras. Así, en Collantes y cols. (2014) señalamos, por ejemplo, la influencia de la gestión que se hace del agua en España. Por tradición y ante las importantes sequías que experimentan ciertas regiones del país, se suele acumular el agua de lluvia en recipientes, para riego en las épocas más desfavorables. Éste puede ser un factor determinante para el establecimiento de nuevas poblaciones de mosquito tigre en ciertas zonas.

Por otro lado, Caminade y cols. (2012) sugirieron que las propiedades del terreno (tipo de suelo, vegetación,...) también pueden influir de manera significativa en la aparición de lugares de cría y, por lo tanto, ser determinantes en el establecimiento del mosquito. De igual manera, estos autores sugieren incluir factores socioeconómicos como cambios en el comercio internacional o el turismo. En este contexto, analizamos los datos de distribución en dos municipios colindantes y de características climáticas similares (Collantes y cols., 2016). Uno de ellos, Terreros (población en el municipio de Pulpí, Almería) es ocupado principalmente durante los meses de verano. El otro, Águilas (Murcia), tiene una población residente estable todo el año, con modificaciones en verano. Al tiempo que *Ae. albopictus* se mantiene presente en septiembre y octubre en Águilas, las trampas dejan de ser positivas en Terreros, encontrando explicación en la ausencia de hospedadores veraneantes de los que alimentarse. Entonces, es importante seleccionar correctamente los meses en los que llevar a cabo la vigilancia en cada lugar. En este sentido, el estudio de la fenología en distintos lugares distantes geográficamente, nos ha permitido observar los momentos de mayor abundancia de trampas positivas y la extensión temporal de la época activa de *Ae. albopictus*. Estos datos podrían ser de gran utilidad para tareas de control de la especie pues podrían servir para crear planes de gestión de la especie en momentos concretos del año.

El recuento de huevos en distintos municipios españoles, ha mostrado que *Ae. albopictus* se mantiene activo durante al menos nueve meses al año. Las primeras puestas de huevos se observaron en el mes de marzo en los municipios de Benicassim y Los Montesinos. En Francia, Lacour y cols. (2015) recogieron las primeras larvas ese mismo mes y relacionan la primera eclosión de larvas, con temperaturas superiores a 10,5°C y 11,25 horas de luz. Considerando que el desarrollo larvario desde que

eclosiona la L1 hasta la pupa puede tener una duración de unas tres semanas a temperaturas entre 14 y 18°C (Hawley 1988), se podría asumir que, en España, los primeros huevos hibernantes salen de la diapausa entre febrero y marzo, quedando probablemente quiescentes hasta que se dan las condiciones climáticas adecuadas para la eclosión y desarrollo larvario. De hecho, el aumento de densidad de huevos no se hace notable en la mayoría de localidades hasta los meses de mayo o junio que coincidiría con las observaciones de Lacour y cols. (2015). Estos investigadores, observaron que las primeras generaciones anuales pueden quedarse largos periodos de tiempo en estadios inmaduros. Concretamente entre 20 y 26 semanas en estadio de huevo y aproximadamente siete semanas en estadios larvarios.

Por otro lado, los últimos huevos se registran en el mes de diciembre en Cartagena, coincidiendo con las pseudofenologías de Barcelona y Mallorca (Collantes y cols., 2015) y que coincide además con los datos de Italia publicados por Toma y cols. (2003). Las últimas tablillas positivas en el resto de municipios se observaron en noviembre coincidiendo con estudios realizados en Portugal (Costa-Osório y cols., 2018). Además, hay que tener en cuenta que ya se han registrado en Murcia actividad reproductora invernal, aunque con pocos efectivos (Collantes y cols., 2014).

Boyer y cols. (2014), en La Reunión, sugieren que el verano es el periodo de mayor riesgo de alcanzar las densidades máximas de mosquitos. Así, nuestros resultados reflejan varios picos de densidad de huevos, uno en julio/agosto y el segundo en septiembre/octubre, coincidiendo con datos de otros estudios realizados en Europa (Toma y cols., 2003; Lacour y cols., 2015; Bonacci y cols., 2015). Los niveles máximos de prevalencia de muestras positivas aparecen en los mismos periodos que tienen lugar los picos de huevos y tienden a disminuir a final de temporada. Los estudios llevados a cabo por Lacour y cols. (2015), darían explicación a esas observaciones ya que determinaron, en laboratorio, que el fotoperiodo crítico del mosquito tigre, (número de horas de luz que recibe la hembra y que induce la diapausa en el 50% de los huevos) era de 13,5 horas. En campo, sin embargo, ese fotoperiodo correspondería a finales de agosto pero sus observaciones situaron a mediados de septiembre el momento en que la mitad de los huevos ya están en diapausa. Ciertas diferencias pueden deberse también a variaciones climáticas, ambientales o, como mencionan algunos autores (Hawley y cols., 1987, 1989), al polimorfismo en la respuesta de las poblaciones al fotoperiodo, que también se ve afectado por variaciones geográficas, concretamente en la latitud de la zona estudiada. A pesar de que nuestros resultados no parecen mostrar ningún patrón diferente de norte a sur, si que ha quedado patente que los picos en verano no son fijos. Las densidades de huevos disminuyen justo después de éstos, quizás debido a que, por el cambio en el fotoperiodo y por efecto de ese porcentaje creciente de huevos que entran en diapausa, tenga lugar una menor eclosión de hembras que repercuta negativamente sobre la abundancia de huevos.

Es posible que las variaciones en las condiciones climáticas (pluviometría, temperatura,...) entre años pueden variar adelantando/atrasando la salida/entrada de los huevos de diapausa y, por lo tanto afecte a las dinámicas de las poblaciones, como

hemos observado en nuestros registros (Lacour y cols., 2015). Incluso, la efectividad de una misma ovitrampa puede variar dependiendo de la mayor o menor existencia de contenedores que acumulen agua derivados de las precipitaciones, que pueden desviar a las hembras grávidas hacia multitud de otros lugares donde poner los huevos y, por tanto, disminuiría la abundancia de huevos en las trampas (Richards y cols., 2006; Fonseca y cols., 2012).

El esfuerzo poco sistemático en nuestro estudio dificulta poder hacer comparaciones entre municipios, ya que no se han empleado el mismo número de trampas ni la misma periodicidad. No obstante, los datos obtenidos han ido en la misma línea sugiriendo que las poblaciones de *Ae. albopictus* en España se comportan de manera similar. Lacour y cols. (2015) consideran que las ovitrampas son inapropiadas para el estudio de dinámica anual del mosquito tigre, o más concretamente para el estudio del inicio de la actividad anual de éste. En algunos de nuestros puntos de seguimiento, la utilización de un número demasiado reducido de trampas, ha ocasionado muy probablemente pérdidas de información. No obstante hemos obtenido datos que sirven de punto de partida para el diseño de estudios más concretos de fenología de esta especie invasora en España.

Sin embargo, hay que gestionar los datos obtenidos de las ovitrampas con cautela para no confundir abundancia de huevos con densidad de población. En este sentido, no podemos saber cómo ha dispersado una hembra su puesta de huevos o cuántas hembras han visitado una ovitrampa. Sin embargo, Richards y cols., (2006) sugieren que cuanto mayor es la densidad de huevos, mayor debería ser la abundancia de hembras en las proximidades de la trampa. Pero la productividad de un lugar de cría, bien sea una trampa o un foco natural, tiene un valor intrínseco que no es constante a pesar de que las condiciones climáticas no varíen (Boyer y cols., 2014). La propia biología del mosquito tigre hace que las hembras tiendan a dispersar (Rozeboom y cols., 1973), pero algunos investigadores han observado patrones distintos en función del momento del ciclo anual estudiado. Así, Fonseca y cols. (2015) observaron, que en verano (fotoperiodo largo), las hembras tienden a distribuir la puesta en diferentes recipientes, preferentemente con ausencia de previas puestas. Sin embargo, en otoño (fotoperiodo corto), prefieren acumular los huevos hibernantes o en diapausa, junto con los de otras hembras.

Podemos señalar dos patrones en el proceso de ampliación de rango de distribución del mosquito tigre en España. En primer lugar, se observa una secuencia de ocupación del mosquito, desde que se citó por primera vez en Cataluña, con un patrón de colonización progresiva por difusión desde municipios positivos desde la costa hacia el interior (Collantes y cols., 2015). Este hecho podía encontrar explicación en la difusión natural del insecto, considerando su limitado rango de vuelo. Sin embargo, la velocidad del proceso dispersivo, así como la detección del mosquito en Orihuela (Alicante), sugirió un patrón de dispersión mediante saltos aleatorios asociado al transporte pasivo de ejemplares en vehículos. Algo similar parece haber ocurrido con algunos casos de Andalucía. Recientemente, un estudio ha encontrado evidencias que

apoyan esta hipótesis en España. Eritja y cols. (2017) señalaron que solo en la provincia de Barcelona entre tres y 16 coches, de mil estudiados, transportan al menos un mosquito tigre en su interior. Esto implica que a diario decenas de miles de coches transportan mosquitos, facilitando así el rápido desplazamiento de *Ae. albopictus*. Por tanto, el aumento de año en año de municipios positivos, implica la aparición año tras año de nuevas regiones exportadoras de mosquitos, hecho que explicaría la aparición de nuevos puntos positivos aleatorios en la geografía. Como hemos mencionado anteriormente, el establecimiento dependerá de la combinación de múltiples factores locales difíciles de predecir.

En cuanto al aspecto de la salud pública, *Ae. albopictus* es particularmente agresivo con las personas por lo que su presencia en una determinada región se traduce rápidamente en una reducción de calidad de vida de sus habitantes (Curcó y cols., 2008; Abramides y cols., 2013; Halasa y cols., 2014). Además de ser un reconocido vector de arbovirosis reemergentes en Europa (dengue y chikunguña). En este contexto, las CCAA deben adaptar a su región el Plan Nacional de Preparación y Respuesta Frente a Enfermedades Transmitidas por Vectores (MSSSI, 2016) y estimar la situación del vector y su abundancia, así como identificar las variables que permiten evaluar el riesgo para la salud humana. Son cada vez más, los organismos oficiales preocupados por la salud pública en su región, los últimos incorporados a la vigilancia de *Ae. albopictus* en España son la Comunidad de Madrid, Castilla la Mancha, Navarra, La Rioja y Galicia. Hasta la fecha, no hemos tenido que lamentar casos autóctonos de dichas enfermedades, pero el registro creciente de casos importados, acentúa la necesidad de tener claros los planes de actuación y respuesta rápida para evitar la aparición de brotes epidémicos. Como mencionaron Millet y cols. (2017), debe existir una buena coordinación entre epidemiólogos, entomólogos, microbiólogos y médicos clínicos para evitar la aparición de brotes epidémicos de zika (y de cualquier otra enfermedad transmitida por mosquitos). Habría que sumar a los servicios de control de mosquitos a esta lista ya que serían la pieza clave en la gestión de las poblaciones de vectores que originarían la epidemia.

En este sentido, el control de esta especie en España sigue siendo un tema complicado. La única estrategia nacional para su gestión es el plan general pero, en realidad, casi toda la responsabilidad de la ejecución pasa a ser competencia municipal. La mayoría de municipios nunca han realizado control de mosquitos y, por lo tanto, las empresas encargadas suelen carecer de la experiencia necesaria para la gestión eficaz de esta especie invasora. No obstante, con el paso del tiempo y el aumento del territorio afectado por el mosquito tigre, son cada vez más numerosas las localidades, conscientes de que los tratamientos en zonas públicas no son suficientes, que han incorporado a sus planes, estrategias de concienciación ciudadana para la eliminación de focos en propiedades privadas. Este es un hecho clave para la reducción de poblaciones adultas de mosquito tigre como varios estudios han podido demostrar (Abramides y cols., 2011; 2013). Es probable que, debido a la falta de estrategias eficaces de detección temprana y control del mosquito tigre, éste siga abarcando nuevos territorios ocupando así gran parte de España y la península.

II. Estructura genética de poblaciones de *Aedes albopictus* detectadas en España (2011-2015).

II.1. Introducción

El mosquito tigre, *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse 1894) (Diptera: Culicidae) es una especie originaria de los bosques tropicales del sudeste asiático. Durante años, su rango de distribución se limitó a este continente. Sin embargo, en las últimas décadas, debido a que esta especie posee una notable capacidad de adaptación a diversos escenarios ecológicos, se ha observado una expansión drástica a través de las regiones tropicales y templadas del mundo. En la actualidad, se conoce que está presente en todos los continentes, a excepción de la Antártida.

Mientras que en su rango nativo, *Ae. albopictus* habita en áreas boscosas, criando en lugares naturales como oquedades en árboles tocones de bambú y otros acúmulos naturales de agua en plantas (fitotelma), en sus nuevos asentamientos es capaz de cerrar su ciclo en recipientes de origen antrópico en áreas urbanizadas. Delatte y cols. (2013) caracterizaron ecológica y genéticamente las poblaciones de mosquito tigre de Isla Reunión y evidenciaron una cierta estructura genética asociada al hábitat. Los adultos de *Ae. albopictus* tienden a elegir ambientes urbanos (donde encuentran con mayor facilidad huéspedes de los que alimentarse y recipientes donde ovipositar), pero prefieren los ambientes naturales para resguardarse.

A pesar de existir una cierta difusión local, a nivel global la dispersión no se ha producido de forma natural ya que el mosquito tigre tiene un limitado rango de vuelo de unos cientos de metros (Hawley, 1988, Honorio y cols., 2003). Su expansión geográfica y consecuente intercambio genético entre poblaciones a gran escala (Failloux y cols., 1997) ha sido posible mediante el transporte de huevos, larvas y adultos en vehículos de distinta índole. Como se ha señalado en la introducción, la expansión de este mosquito por Europa coincide con la ola de introducciones de especies invasoras en el continente, que comenzó hace 30 años como resultado de la globalización.

II.1.1. Diversidad genética y las invasiones biológicas

La variabilidad genética o diversidad genética, en sentido amplio, es el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones de una misma especie (Piñero y cols., 2008).

A menudo se presupone que las poblaciones invasoras están sujetas a efectos fundadores (colonización por pocos individuos y, por ende, con limitado número de alelos) que conducen a medio/largo plazo a una reducción de la diversidad genética en el rango de invasión (Handley y cols., 2011). Pero una invasión biológica es algo diferente a un proceso de dispersión natural. Se producen tres fases que implican la dispersión inicial, el establecimiento de poblaciones y la propagación (Kolar y Lodge, 2001; Lockwood y cols., 2005). En la fase inicial de dispersión, se produce lo que se denomina la presión de propágulo (Kolar y Lodge, 2001; Lockwood y cols., 2005), que viene determinada y modulada por la cantidad de invasores y la frecuencia de

introducción (Handley y cols., 2011; Bock y cols., 2015). Cuando el número de propágulos es alto y, sobre todo, si viene de una gran variedad de lugares, no tiene que producirse una situación de efecto fundador porque la diversidad de partida no es baja, la inmigración real tampoco lo es y, al no haber mucho aislamiento real, la deriva genética se ve disminuida.

Existen pocos trabajos que hayan observado como estos aspectos han interferido en el proceso de dispersión de *Ae. albopictus* y en la reducción de la variabilidad genética (Gourbet y cols., 2016). De hecho, más bien ha tenido lugar lo contrario. Muchos de los estudios genéticos actuales llevados a cabo con muestras de diferentes países han justificado que no ha podido ocurrir una dispersión progresiva de esta especie desde su área nativa (Asia), sino que han acontecido diferentes procesos de dispersión a lo largo del tiempo, desde múltiples orígenes, mediados principalmente por actividades humanas (Roche y cols., 2015; Manni y cols., 2015). Este hecho, proporciona sin duda un aporte continuo de variabilidad genética a las poblaciones y podría influir en la capacidad de adaptación a cambios ambientales y en la dispersión y acabar teniendo consecuencias evidentes sobre la salud pública (Manni y cols., 2015; Battaglia y cols., 2016; Maynard y cols., 2017; Kotsakiozi y cols., 2017; Sherpa y cols., 2018).

II.1.2. La genética de poblaciones como herramienta de gestión

La investigación sobre las características genéticas de una población de mosquitos puede proporcionar una información útil para su gestión. En primer lugar, la identificación de las rutas de dispersión del mosquito tigre es crucial para limitar su diseminación y diseñar estrategias preventivas y de control (Manni y cols., 2017). En segundo lugar, distintos autores han asociado el origen geográfico con mutaciones genéticas asociadas a resistencias a insecticidas, por lo que puede tenerse en cuenta a la hora en las campañas de control del vector (Xu y cols., 2016; Chen y cols., 2016; Aguirre-Obando y cols., 2017). En tercer lugar, existen trabajos que asocian el origen geográfico de las poblaciones con diferencias en cuanto a la interacción entre el vector y patógeno (de Oliveira., 2003; Zouache y cols., 2014; Chouin-Carneiro y cols., 2016). En Europa, ya se ha relacionado a esta especie con los recientes brotes autóctonos de dengue y chikunguña acontecidos en Francia e Italia.

II.1.3. Estudios genéticos de *Ae. albopictus*

La elección de los marcadores moleculares, por lo general, viene determinada por los objetivos concretos de cada estudio. En muchos casos, ante la necesidad de plantear diferentes incógnitas y dado que un buen marcador genético se caracteriza por tener suficiente variabilidad, los autores optan por combinar diferentes tipos de marcadores con el fin de obtener mayor resolución y respuesta a sus hipótesis. La revisión de Aguirre-Obando y Navarro-Silva (2017) recopila que en los estudios moleculares de *Ae. albopictus* se han empleado isoenzimas/alozimas, ADN genómico y ADN mitocondrial, con diversos métodos como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), microsatélites, y el estudio concreto de los genes de la citocromo oxidasa, subunidad I, (COI)(ADNmt), la NADH deshidrogenasa

5 (ND5)(ADNmt) y espaciadores de ADNr, en concreto los espaciadores transcribibles internos (ITS=*Internal transcribed spacer*)(ADNg).

La detección de *Ae. albopictus* en Estados Unidos en los años 80 fue el punto de partida del estudio de genética de poblaciones de esta especie (Goubert y cols., 2016). El estudio continuado de la estructura y diversidad genética de este mosquito mediante el uso de distintas técnicas moleculares en constante evolución, está ayudando a entender mejor el proceso dispersivo acontecido en las últimas décadas, al identificar los orígenes y la frecuencia de las introducciones de la especie en distintos puntos del planeta (Urbanelli y cols., 2000; Mousson y cols., 2005; Zitko y cols., 2011; Kamgang y cols., 2011; Porretta y cols., 2012; Zhong y cols., 2013; Shaikevich y Talbalaghi., 2013), Manni y cols., 2015; Battaglia y cols., 2016; Manni y cols., 2017; Kotsakiozi y cols., 2017; Maynard y cols., 2017). Estos trabajos han evaluado la distribución de las poblaciones así como la velocidad y la dirección de la dispersión. Son estudios que han apoyado la hipótesis de múltiples y aislados procesos de dispersión a escala global de la especie desde su área nativa. Inicialmente Urbanelli y cols. (2000) demostraron la afinidad genética entre las poblaciones de Japón, Estados Unidos e Italia. Años más tarde, Ayres y cols. (2002) y Birungi y cols. (2002) justificaron que las poblaciones de Brasil derivaban de un proceso invasivo independiente y no de una expansión desde Estados Unidos. Posteriormente, Lounibos y cols. (2003) asociaron este evento de dispersión con aspectos biológicos de las poblaciones.

Las secuencias del ADNmt, y concretamente las del gen de la COI), han sido muy utilizadas para el estudio de poblaciones debido a que su rápida tasa de mutación permite diferenciar poblaciones y especies cercanamente emparentadas. De esta forma, las relaciones entre poblaciones distantes geográficamente se valoran por medio de la herencia del linaje materno (Loaiza y cols., 2012). Algunos autores señalan que es posible que existan patrones genéticos en el COI de poblaciones de *Ae. albopictus*, con respuesta a un determinado fotoperiodo y que podría contribuir al aumento del flujo génico así como al éxito de la invasión entre regiones climáticamente similares (Birungi y cols., 2002; Mousson y cols., 2005).

Así, Zhong y cols. (2013) observaron que las muestras procedentes de ejemplares capturados en Los Angeles (EEUU) en 2001 que compartían haplotipos con Singapur no se detectaban en las muestras de mosquitos capturados en 2011, sugiriendo que solo los genotipos procedentes de climas templados consiguen establecerse en los Estados Unidos. En África central, Kamgang y cols. (2011) plantearon que las poblaciones de Camerún eran más afines a poblaciones de origen tropical (India, Tailandia, Vietnam y Brasil) que a poblaciones templadas (Francia, Grecia y Estados Unidos), apuntando también a la posibilidad de múltiples eventos de invasión. En Australia, los trabajos de Beebe y cols. (2013) mostraron como la afinidad genética entre poblaciones puede ayudar a reconstruir la historia demográfica. Pudieron diferenciar genéticamente las poblaciones de las islas Torres Strait (más afines a las de Indonesia) de las poblaciones más antiguas ya establecidas en Papúa Nueva Guinea. Con este hecho, descartaron el proceso de dispersión geográfica por proximidad y los autores relacionaron el proceso

con la intensa actividad de pesca furtiva en la zona. De hecho, Manni y cols. (2017) citan al transporte marítimo presente en el este de Asia como responsable histórico de la difusión de propágulos en los mares de China (mar de China oriental y mar de China Meridional) (Schottenhammer., 2012).

El diseño de nuevos *primers* para el COI y el mayor conocimiento de la variabilidad existente en distintas partes de Asia, permitió detectar que existe una gran diversidad genética en el área de origen de *Ae. albopictus* (Porretta y cols., 2012; Zhong y cols., 2013). Battaglia y cols. (2016) realizaron análisis filogenéticos utilizando mitogenomas, y detectaron que las muestras de origen asiático se agrupaban en cinco *clusters*, pero tan solo tres de ellos estaban involucrados en los procesos recientes de expansión global.

Shaikevich y Talbalaghi, (2013) simultanearon el estudio de COI y ITS2 ribosomal. Éste último, es un marcador polimórfico que ha resultado muy útil para determinar la diferenciación entre poblaciones y dentro de las poblaciones de mosquito tigre, así como para llevar a cabo estudios filogenéticos (Aguirre-Obando y Navarro- Silva, 2017). Manni y cols. (2015) lo utilizaron junto con el estudio de microsátelites, para estudiar la diversidad genética así como las dinámicas de dispersión de la especie entre zonas de reciente colonización y zonas con poblaciones ya establecidas. Sugirieron que la difusión global no fue fruto de una expansión progresiva desde su origen sino que recientemente se han producido constantes propágulos caóticos asociados a las actividades humanas.

II.1.4. Justificación y objetivos

Por la ausencia de trabajos sobre genética de poblaciones de *Ae. albopictus* en España y la necesidad de esta información para los planes de gestión, se consideró de gran interés describir por primera vez la estructura genética de dichas poblaciones tras varios años de dispersión. Se trató de determinar el o los orígenes de las poblaciones españolas de mosquito tigre, así como comprender los patrones de distribución y dispersión a lo largo de los años en España.

Combinando información genética con datos georeferenciados, se pretendió determinar cómo los factores geográficos pueden estructurar las poblaciones de *Ae. albopictus* en España y si las características del paisaje como pueden ser las carreteras influyen en el flujo génico entre poblaciones de esta especie. La estructura genética puede estar determinada espacialmente, en primera instancia, por la distribución de las poblaciones en el espacio y la distancia entre éstas. La presencia de infraestructuras antropogénicas como carreteras y áreas urbanizadas así como barreras naturales como pueden ser las condiciones climáticas, pueden determinar la variabilidad genética existente entre poblaciones de una misma especie. Así, el intercambio de genes entre poblaciones debido a la migración de los individuos de un lugar a otro, es un factor importante de cambio genético (Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez., 2013). Conocer por tanto la dinámica de dispersión así como la estructura genética de las poblaciones de mosquito tigre detectadas en España podría ayudar a

entender la afinidad genética entre ellas así como con las de otros lugares del mundo. Todas estas observaciones contribuirían a evaluar los riesgos asociados a la presencia de este vector en nuestro país.

Estas motivaciones corresponden con el objetivo 3 de este trabajo de tesis doctoral, *Conocer la estructura genética de algunas de las poblaciones detectadas en España*, que podría concretarse en dos subobjetivos específicos:

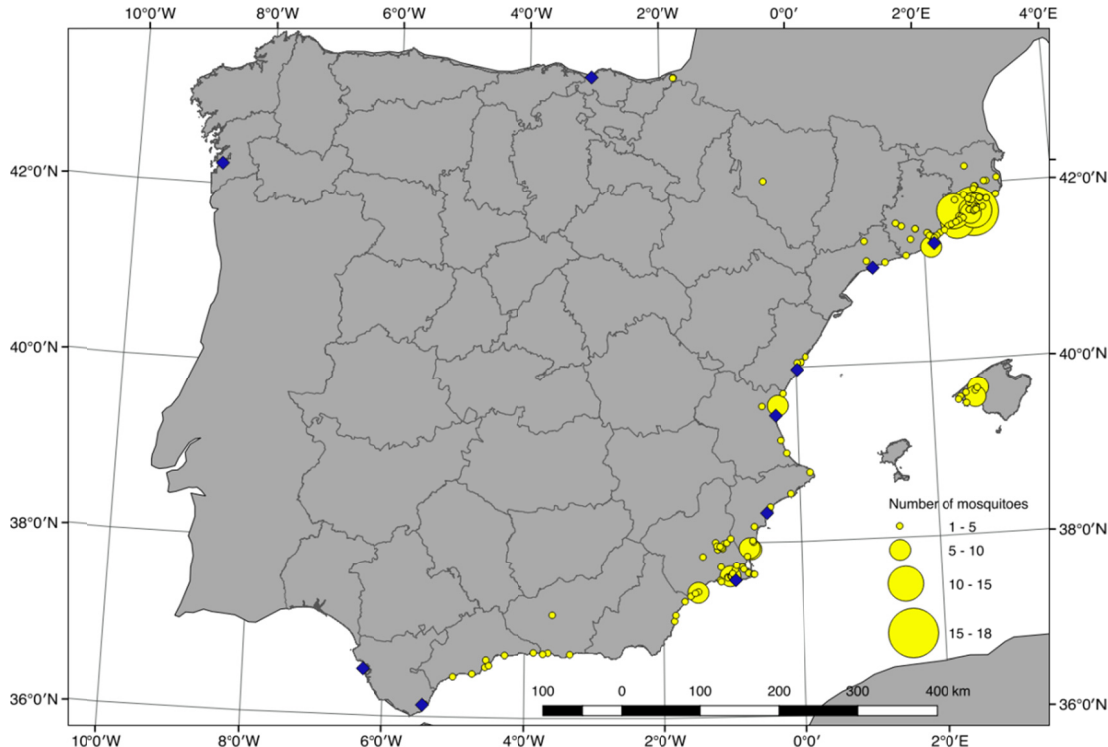
- i. Conocer la estructura genética de las poblaciones de *Ae. albopictus* detectadas en España.
- ii. Interpretar el proceso de dispersión por España, temporal y geográficamente, asociado a su estructura genética.

II.2. Material y métodos

II.2.1. Obtención del material entomológico

Se estudiaron 477 individuos de *Ae. albopictus* procedentes de toda el área de distribución conocida de la especie en España (figura 2.1.). A lo largo del proceso de muestreo, descrito en el capítulo 1, se obtuvieron tablillas con huevos de diferentes localidades a lo largo de los años 2011-2015.

Figura 35. Geolocalización de las muestras de mosquitos analizadas genéticamente



Los círculos amarillos simbolizan las ubicaciones de las muestras centradas, con un radio proporcional al número de mosquitos muestreados en cada ubicación. Los diamantes azules indican la ubicación de los principales puertos comerciales en España (puertos con más de 50,000 TEU, basados en los datos de 2013 del AAPA (American Association of Port Authorities)).

También se obtuvieron muestras de Cataluña a partir de la campaña de captura de mosquito tigre organizada por el Centre d'Estudis Avançats de Blanes (CEAB-CSIC). Además, como datos complementarios, se analizaron 40 individuos de dos regiones diferentes de Francia (Niza, N 43° 38 '32"-E 7° 5' 27", y Montpellier, N 43° 40' 39"-E 4° 2 '35") y cuatro individuos de una región de Grecia (área de Pylaia, en Salónica, N 40° 27' 22"-E 23° 13 '20").

Los huevos se llevaron al insectario del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, donde se llevó a cabo su eclosión y cría de los individuos, obteniéndose larvas o adultos para el estudio, según las recomendaciones de Alarcón-Elbal y cols. (2010). Todas las muestras se almacenaron en etanol absoluto y se mantuvieron a -20°C hasta su posterior análisis.

II.2.2. Análisis genéticos

El procesado de las muestras, la extracción de ADN y realización de la PCR cuantitativa (qPCR) se llevó a cabo en el Centre d'Estudis Avançats de Blanes (CEAB-CSIC).

II.2.2.1. Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

La extracción del ADN se hizo a partir de los ejemplares enteros (larvas o adultos). Se siguió el protocolo HotShot (Montero-Pau y cols., 2008), utilizando 125µL de Alkaline lysis buffer y 125µL de Tris-HCl para neutralizar la reacción. Los extractos se conservaron a -20°C.

Se llevó a cabo la amplificación de una parte del COI, con la técnica de qPCR (Polimerase Chain Reaction) y se obtuvo un volumen total de reacción de 25µL por muestra, que contenía 2µL de ADN extraído y 23µL de Master Mix Solution [16,2125µL de mQ-H₂O esterilizada con luz UV; 2,65µL de 10x Reaction Buffer (NoMgCl₂, Silverstar Eurogentec); 0,775µL de 50 mM MgCl₂; 2,125µL de 2,5mM dNTPs; 0,2125µL de 5µM TaQ Polimerasa; 0,525µL de cada cebador con una concentración de 10µM]. Los cebadores fueron el LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAA GATATTGG-3') y el HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') según Folmer (1994); o los cebadores degenerados de Prosser y cols. (2013) ZplankF1_M13 (5'-TGTAACACGACGGCCAGTTCTASWAATCATAARGATATTGG-3') y Zplank R1_M13 (5'-CAGGAAACAGCTATGACTTCAGGRTGRTG RCCRAARAATCA-3').

También se amplificó el fragmento ITS2 del ADN nuclear, obteniendo un volumen total de reacción de 25µL por muestra que contenía 7µL de ADN extraído y 18µL de Master Mix Solution (11,2125µL de mQ-H₂O esterilizada con luz UV; 2,625µL de 10 x Reaction Buffer (NoMgCl₂, Silverstar Eurogentec); 0,775µL de 50 mM MgCl₂; 2,125µL de 2,5mM dNTPs; 0,2125µL de 5µM TaQ Polimerasa y 0,525µL de cada cebador con una concentración de 10µM. Los cebadores fueron el ITS-CP-P1A (5'-GTGGATCCTGTGAACTGCAGGA CACATG-3') situado en el gen 5.8S y el ITS-CP-P1B (5'-GTGTCGACATG CTAAATTTAGGGGGTA-3') situado en el gen 28S (Porter & Collins 1991).

Las amplificaciones se realizaron con un termociclador Primus 96 Plus (MWG AG Biotech, Germany) o 2720 thermal cycler (Applied Biosystems, UK) siguiendo los programas de PCR específicos para cada cebador (Tabla 16).

Tabla 16. Programación detallada de la PCR para los cebadores utilizados

Marcador	Cebadores	Programación PCR
COI	ZplankF1_M13 ZplankR1_M13	35 ciclos (1' a 95°C, 2' a 37°C y 1' a 72°C)
	LCOI490 HCO2198 (Folmer, 1994)	5' a 95°C, 5 ciclos (1' a 95°C, 90" a 45°C y 45" a 72°C), 30 ciclos (45" a 95°C, 45" a 50°C y 45" a 72°C) y una elongación final de 7' a 72°C
ITS2	CP-P1A CP-P1B	1' a 94°C, 5 ciclos (40" a 94°C, 40" a 94°C, 2' a 37°C y 1' a 72°C), 35 ciclos (40" a 94°C, 40" a 51°C y 1' a 72°C) y una elongación final de 6' a 72°C

La comprobación de las amplificaciones se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (1g de agarosa en 100mL 0.5x tampón TAE (Tris, acetato y EDTA) a lo que se añade 5 µL de *Red gel* para poder visualizar el ADN mediante los programas *Molecular Imager® - Gel Doc™ XR Imaging System* así como *Quantity One*.

Los productos de PCR que se amplificaron correctamente fueron purificados y enviados a secuenciar a Macrogen (Seúl, Corea).

II.2.3. Análisis de datos

Las secuencias resultantes de los genes COI e ITS2 se alinearon manualmente con las secuencias de cada gen disponibles para la especie *Ae. albopictus* en GenBank mediante el programa MEGA 6 (Tamura y cols., 2013). Para permitir la correcta comparación de estudios, las secuencias disponibles en bases de datos deben tener un tamaño similar así como compartir, al menos, parte de la región del gen en cuestión estudiado.

Existen hoy en día gran cantidad de métodos descritos en la literatura sobre genética de poblaciones para estimar la diferenciación y la estructura genética. Las distintas medidas de estructura genética están relacionadas entre sí y se basan en analizar las diferencias en las frecuencias alélicas. Algunas pruebas más sencillas comparan estas últimas estadísticamente. Otras, en cambio, estiman la proporción de variación genética que se encuentra dentro y entre las poblaciones determinando la estructura genética poblacional de las mismas. Para ello, se suele emplear el índice de fijación (FST), o sus análogos, que permite comparar cuantitativamente la diferenciación existente entre poblaciones de distintas localidades geográficas de una misma especie. Estos estimadores no sólo señalan las diferencias, sino que también ofrecen una estimación de la deriva genética y el flujo génico.

Por otro lado, existen diferentes maneras de medir las distancias genéticas entre pares de poblaciones. Se puede evaluar el número de sustituciones nucleotídicas en el ADN o se pueden utilizar las distancias genéticas entre pares de poblaciones para reconstruir sus genealogías.

En nuestro estudio, la diversidad genética se calculó con el programa DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009) aplicando el índice de diversidad haplotípica o heterocigosidad (H_d), la estimación de la diversidad de pares de nucleótidos o diversidad nucleotídica (π), el contenido de G+C y el número de haplotipos y de sitios (loci) variables. Se realizaron estimaciones genealógicas y se transformaron los árboles filogenéticos tradicionales en genealogías de haplotipos (Salzburger y cols., 2011). Para ello, primero se seleccionó el modelo más apropiado de evolución de nucleótidos mediante el jModelTest (Posada, 2008) bajo el criterio de información Akaike (AIC). Se introdujeron las secuencias de COI o ITS2 obtenidas de cada individuo, que fueron posteriormente representadas en forma de haplotipos. Las secuencias en las que se observaron bases ambiguas no se incluyeron en los análisis. La red de haplotipos se construyó finalmente con el programa Haploviewer (Salzburger y cols., 2011) en base al mejor árbol obtenido.

La historia demográfica de una población también deja huella en los genomas actuales (Perfectti y cols., 2009). Existen diferentes metodologías para estimar patrones demográficos usando secuencias de ADN. En el presente trabajo se realizaron pruebas de neutralidad con los estadísticos D de Tajima (Tajima, 1989) y F_s de Fu (Fu, 1997), con 10.000 permutaciones en el programa Arlequin v.3.5 (Excoffier y Lischer, 2010) mediante distribuciones pareadas (mismatch distributions) utilizando el programa DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009). El estadístico D compara dos estimas de la cantidad de variación genética de un grupo de secuencias. El test de Fu también calcula las diferencias entre secuencias, pero se basa en el hecho de que las mutaciones se acumulan de manera diferente en una filogenia, así las mutaciones puramente neutrales se observan a lo largo de toda la filogenia mientras que las que son deletéreas lo harán únicamente en las ramas externas indicando que tuvieron lugar de manera reciente ya que la selección habrá tenido tiempo de eliminar aquellas mutaciones más antiguas (Perfectti y cols., 2009). El test de Fu puede detectar un exceso de alelos raros. Así, se asume que la identificación de patrones de selección no neutrales con alto número de polimorfismos se puede corresponder con expansiones poblacionales recientes (valores negativos de los índices D y F_s) que pueden o no estar asociadas a procesos de barrido selectivo (*selective sweep*) o cuello de botella (*bottleneck*).

La diferenciación genética debida al aislamiento por distancia entre poblaciones se evaluó mediante un análisis espacial de la varianza molecular (SAMOVA) con el programa SAMOVA versión 2.0 (Dupanloup y cols., 2002). Esta aproximación identifica grupos de poblaciones que son genéticamente y geográficamente homogéneos y los diferencia de otros. El método requiere de la definición *a priori* del número de grupos de poblaciones ($=K$, en nuestro caso provincias españolas) y genera estadísticos F . Se prueban diferentes combinaciones de grupos (K) y la simulación permite identificar cuál de las combinaciones de esos K grupos maximiza el índice F_{CT} (la proporción de la varianza genética total debida a las diferencias entre los grupos de diferentes provincias españolas), y a su vez ver cómo las distintas provincias se van diferenciando jerárquicamente mostrando parte de la historia de colonización en España. Se realizó el test simulando desde dos a doce grupos ($K=2$

hasta $K=12$). Los valores de F_{CT} para cada grupo (K), se obtuvieron a partir de 100 condiciones iniciales aleatorias que se repitieron con la partición diferente de las poblaciones en los K grupos.

II.3. Resultados

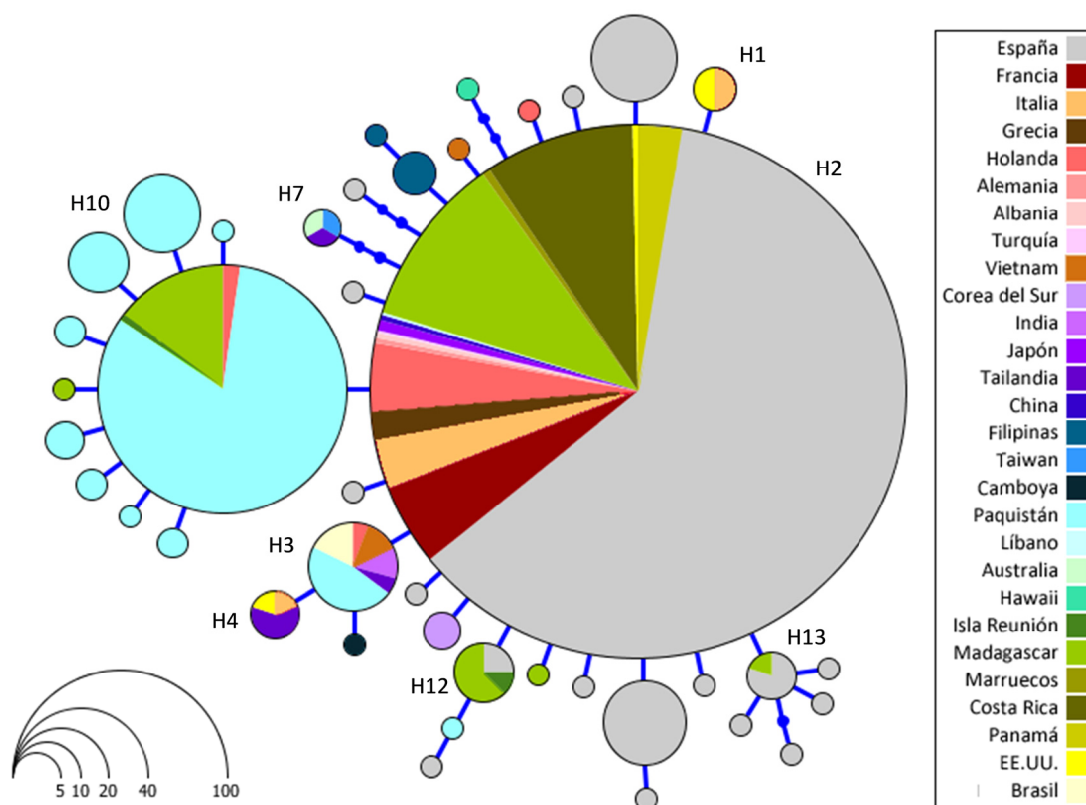
II.3.1. COI

En el caso de *Ae. albopictus*, existen multitud de secuencias del COI en GenBank. Sin embargo, la mayoría sólo comparten una pequeña región de 295pb (Goubert y cols., 2016). Este hecho dificulta, en ocasiones, la posibilidad de comparar los resultados de los estudios. El genoma mitocondrial del mosquito tigre tiene una longitud de 16.665pb (GenBank). En éste, se dispone el gen COI que tiene una longitud de 1536pb, que se sitúa entre las posiciones 1436-2972pb del genoma.

Con el fin de tratar de determinar el origen geográfico, así como las relaciones filogenéticas de las poblaciones de *Ae. albopictus* detectadas en España, se alinearon las 424 secuencias obtenidas de las muestras recogidas en el periodo 2011-2015 (longitud de 513 pb) con aquellas secuencias del mundo compatibles descargadas del GenBank. Con todas ellas se pudo construir una red de haplotipos mundial (Figura 36). Ésta permite deducir las relaciones existentes entre las secuencias analizadas, ya que la red está diseñada a partir de la relación filogenética de los distintos haplotipos. Así, en nuestro estudio, como se puede apreciar en la Figura 36, se han representado 41 haplotipos. En España, se han descrito 18 de ellos (en color gris de la Figura 36), pero cabe mencionar que tan solo tres son compartidos con otros países y los otros 15 son haplotipos únicos que hasta la fecha, solo se han descrito en España.

Al estudiar con detalle la red de haplotipos del marcador COI, se observa que la mayoría de haplotipos representados derivan del H2, que es el más frecuente y abundante, tanto en las muestras de España (de todos los años) como en el resto de países (Francia, Italia, Grecia, Holanda, Alemania, Albania, Japón, Tailandia, Isla Reunión, Madagascar, Marruecos, Costa Rica, Panamá y Estados Unidos América). De este haplotipo ramifican el resto, con distintos cambios nucleotídicos. Dos haplotipos en España, con un cambio nucleotídico cada uno respecto al H2, relacionan las poblaciones españolas con las de Madagascar e Isla Reunión. Concretamente, el H12 muestra afinidad de dos secuencias de Andalucía de 2015 (reciente expansión en España) con una secuencia de Isla Reunión y cinco de Madagascar. El H13 incluye tres secuencias de Gerona de distintos años, una de Barcelona de 2015 y una de Madagascar.

Figura 36. Red de haplotipos para el gen COI



Los círculos muestran los distintos haplotipos y su diámetro es directamente proporcional a la abundancia de secuencias incluidas. Las líneas que unen los círculos expresan las distancias genéticas y cada marca en la línea supone el número de mutaciones entre haplotipos conectados. Los distintos colores permiten reconocer que haplotipos están descritos en cada país. A pesar de que Isla Reunión pertenece políticamente a Francia, hemos diferenciado las muestras con distinto color debido a la relevancia de las distancias geográficas en los estudios.

Otros haplotipos en la red relacionan otros países entre sí. El segundo haplotipo más abundante, que solo varía con un cambio respecto a H2, el H10 que agrupa secuencias de Pakistán, Isla Reunión, Madagascar y Holanda. El H3 relaciona Brasil, Holanda, Vietnam, India, Tailandia y Pakistán. Con solo un cambio nucleotídico de éste último, el haplotipo H4 relaciona las secuencias de EEUU con Italia y Tailandia. El H7, con tres cambios respecto al H2, agrupa secuencias de Australia, Taiwán y Tailandia. Por último, el H1 relaciona las muestras de EEUU con las de Italia. El resto de haplotipos representados son exclusivos de cada país de referencia.

Como se puede ver en la Tabla 17, se pudo detectar más de un haplotipo en 8 de las regiones estudiadas de España. A pesar de ello, la diversidad genética (H_d) de las secuencias analizadas del COI fue muy baja, siendo 0 en algunas provincias donde solo se detectó el haplotipo H2. En Alicante, se obtuvo la H_d más elevada, con 4 haplotipos y la mayor diversidad nucleotídica (π). Ésta última, en general fue muy baja también. Era de esperar estos valores bajos, puesto que se observaron muy pocos lugares polimórficos durante los alineamientos, con un máximo de 10 en la provincia de Barcelona, que es el lugar donde mayor número de secuencias se analizaron.

Tabla 17. Resultados estadísticos de la diversidad genética encontrada en el gen COI

Provincia	año	N	S	Haplotipos	Fh	Hd	(media± SE)
Barcelona	2004	104	10	H2,H8,H9,H11,H13, H14,H19,H22	0,077	0,262	0,0008 ± 0,0003
Gerona	2008	80	5	H2,H6,H8,H13,H15,H20	0,075	0,233	0,0005 ± 0,0003
Tarragona	2005	7	1	H2,H8	0,286	0,286	0,0006 ± 0,0005
Mallorca	2012	40	2	H2,H8,H16	0,075	0,145	0,0003 ± 0,0002
Huesca	2015	3	0	H2	0,333	0,000	0,0000
Castellón	2010	7	1	H2,H5	0,286	0,286	0,0006 ± 0,0005
Valencia	2013	20	0	H2	0,050	0,000	0,0000
Alicante	2006	16	4	H2,H23,H18,H21	0,250	0,350	0,0014 ± 0,0007
Murcia	2011	110	2	H2,H17,H21	0,027	0,240	0,0005 ± 0,0004
Málaga	2014	20	1	H2,H12	0,100	0,190	0,0004 ± 0,0004
Granada	2014	4	0	H2	0,250	0,000	0,0000
Almería	2014	7	0	H2	0,143	0,000	0,0000
Guipúzcoa	2014	6	1	H2	0,333	0,190	0,0000

año = primera detección, N= número de secuencias, S= n°de lugares polimórficos,

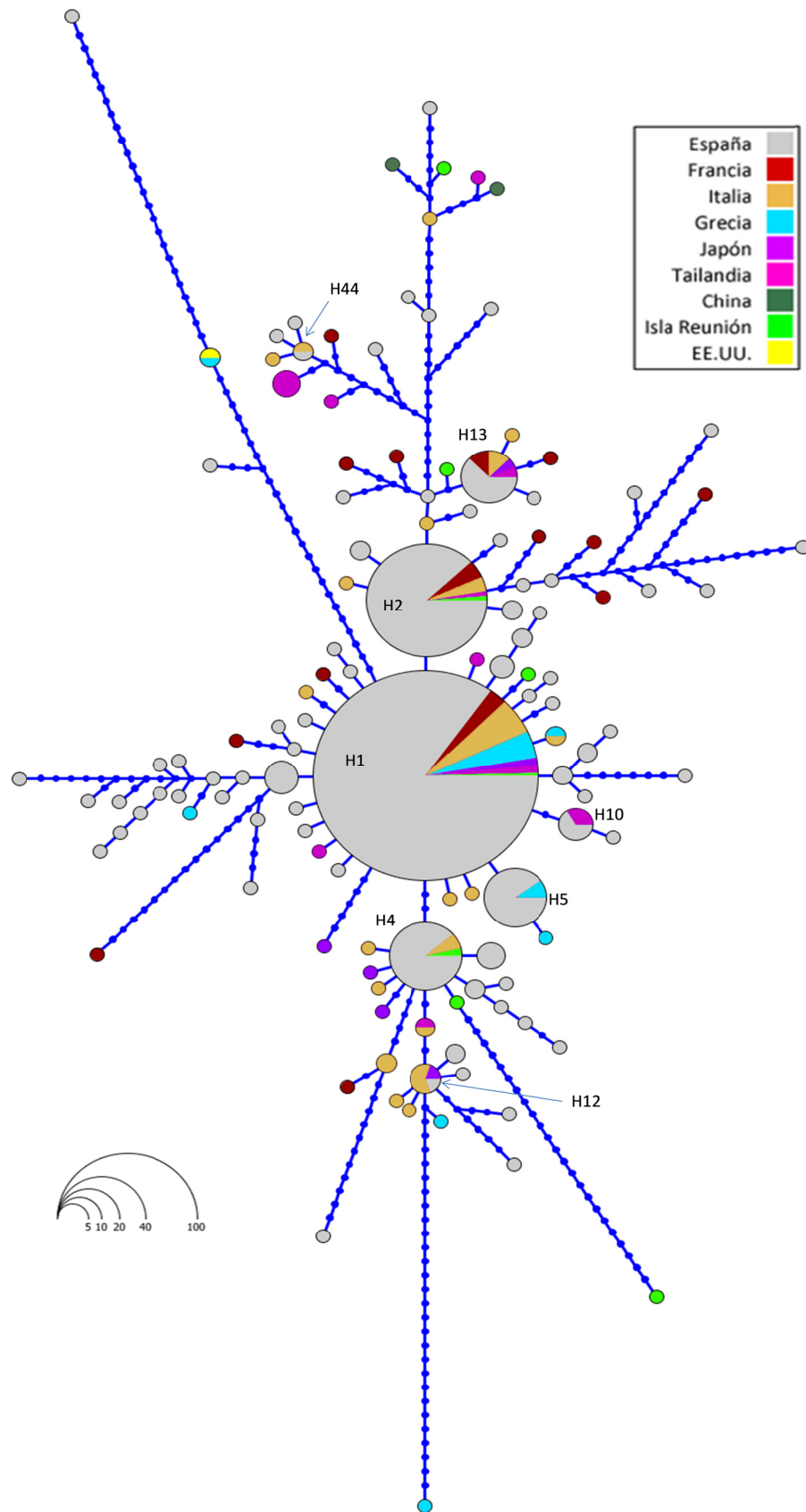
Fh= frecuencia haplotípica, Hd= diversidad genética, π = diversidad nucleotídica,

II.3.2. ITS2

La región del ITS2 se encuentra entre los genes 5,8S y 28S del DNA ribosomal. Se secuenciaron 424 individuos de las muestras recogidas en el periodo 2011-2015, en diferentes provincias de España. Se alinearon con aquellas secuencias del ITS2 del mundo compatibles del GenBank, con una longitud de 287pb. Actualmente, no se dispone de muchas secuencias de ITS2 de *Ae. albopictus* debido a existen pocos trabajos en los que se haya empleado este marcador para estudiar esta especie.

Posteriormente, se construyó una red de haplotipos mundial de este marcador que cuenta con 124 haplotipos (Figura 37). De los 78 que se han descrito en España, 70 son únicos y nunca antes citados. Al estudiar con detalle la red de haplotipos del ITS2, se aprecian cinco haplotipos abundantes, siendo el H1 el dominante y del cual ramifican el resto. Este haplotipo está presente en España pero también se ha encontrado en Francia, Italia, Grecia, Japón, Tailandia e Isla Reunión. En segundo lugar en abundancia y con un único cambio o mutación respecto al anterior, observamos el H2. Incluye secuencias de varios años de vigilancia en España junto a otras de Francia, Italia, Isla Reunión y Tailandia. El tercero es el haplotipo H5, con una sola mutación respecto al H1, y que se ha encontrado en España y Grecia. Con tres cambios nucleotídicos, el haplotipo H4, obtenido en España, Italia e Isla Reunión. El H12 presenta 7 cambios respecto al H1 y ha sido hallado en Gerona, Italia y Japón. El quinto en abundancia (H13), con 4 cambios respecto al el H2 (6 desde el H1) se ha obtenido en España, Francia, Italia, Isla Reunión, Japón y Tailandia.

Figura 37. Red de haplotipos del gen ITS2



Cabe destacar dos haplotipos que, a pesar de no ser de los más abundantes, pueden resultar muy informativos. El primero (H10) se ha encontrado tanto en Gerona como en Tailandia y el otro (H44) se ha encontrado tanto en Mallorca (muestras de 2015) como en Italia.

Como se puede ver en la Tabla 18, el análisis del ITS2 ha permitido observar que existe mayor diversidad genética (Hd) y nucleotídica que en el COI, debido a que detecta mucho mejor los polimorfismos, por lo que se obtiene mucha más información de las relaciones genéticas de la especie entre regiones. Aparentemente, no existe ninguna estructura genética definida en las poblaciones españolas, en cuanto a que los haplotipos se encuentran a menudo mezclados en las diferentes provincias muestreadas. Así, destacan las poblaciones de Guipúzcoa con dos haplotipos diferentes, y un número elevado de polimorfismos, y las poblaciones de Málaga, donde la Hd es elevada, con nueve haplotipos encontrados en 10 secuencias estudiadas.

Tabla 18. Resultados estadísticos de la diversidad genética encontrada en el gen ITS2

Provincia	año	N	S	Haplotipos	Fh	Hd	π (media \pm SE)
Barcelona	2004	104	32	H1,H2,H4,H5,H6,H9, H10,H11,H13,H14,H15, H16,H17,H18,H19,H20, H21,H25,H28,H29,H48, H52,H55,H56,H59	0,231	0,693	0,005 \pm 0,001
Gerona	2008	84	54	H1,H2,H4,H5,H10,H12, H13,H14,H15,H19,H23, H24,H26,H27,H30,H46, H52,H57,H60	0,238	0,628	0,006 \pm 0,002
Tarragona	2005	4	2	H1,H5,H58	0,750	0,833	0,004 \pm 0,002
Mallorca	2012	33	35	H1,H4,H5,H13,H31,H32, H33,H40,H41,H42,H43, H44,H45,H46,H47,H48, H49,H50	0,545	0,847	0,012 \pm 0,003
Huesca	2015	5	10	H1,H51,H52,H53,H54	1,000	1,000	0,014 \pm 0,005
Castellón	2010	7	5	H1,H65,H66	0,714	0,524	0,007 \pm 0,003
Valencia	2013	18	17	H1,H5,H34,H35,H62, H63	0,333	0,490	0,006 \pm 0,002
Alicante	2006	34	17	H1,H2,H3,H4,H5,H6, H7,H8,H9,H61	0,294	0,729	0,005 \pm 0,002
Murcia	2011	111	15	H1,H2,H4,H5,H15,H22, H36,H37,H38,H67,H70, H71	0,117	0,658	0,004 \pm 0,002
Málaga	2014	10	26	H1,H2,H4,H13,H68, H72,H73,H74,H76	0,900	0,978	0,020 \pm 0,005
Granada	2014	6	14	H1,H69,H75,H78	0,667	0,800	0,022 \pm 0,007
Almería	2014	6	4	H1,H2,H77	0,500	0,600	0,005 \pm 0,002
Guipúzcoa	2014	2	19	H39,H64	1,000	1,000	0,064 \pm 0,016

año= primera detección, N= número de secuencias, S= n° de lugares polimórficos,

Fh= frecuencia haplotípica, Hd= diversidad genética, π = diversidad nucleotídica,

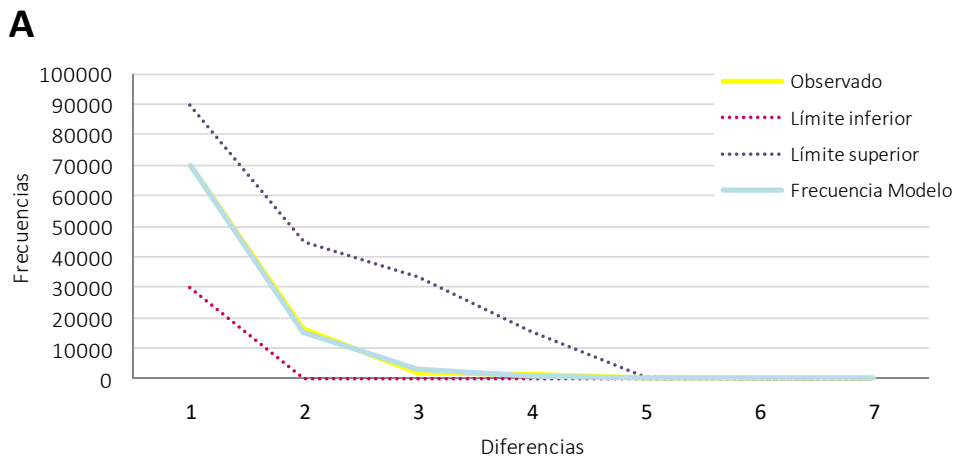
II.3.3. Análisis poblacionales

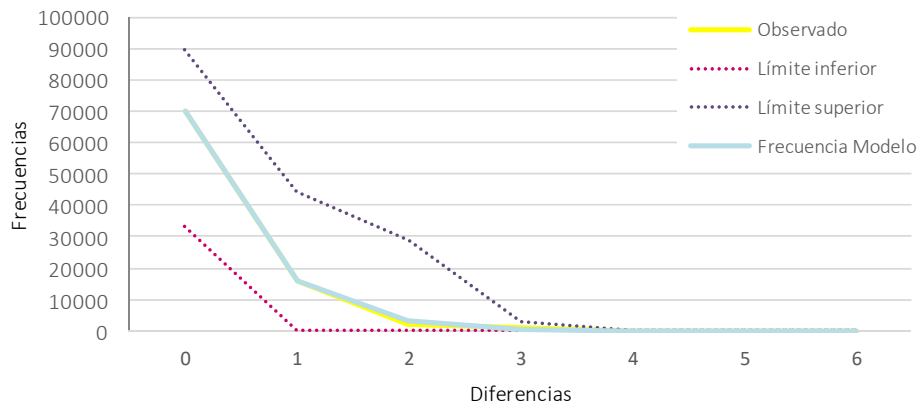
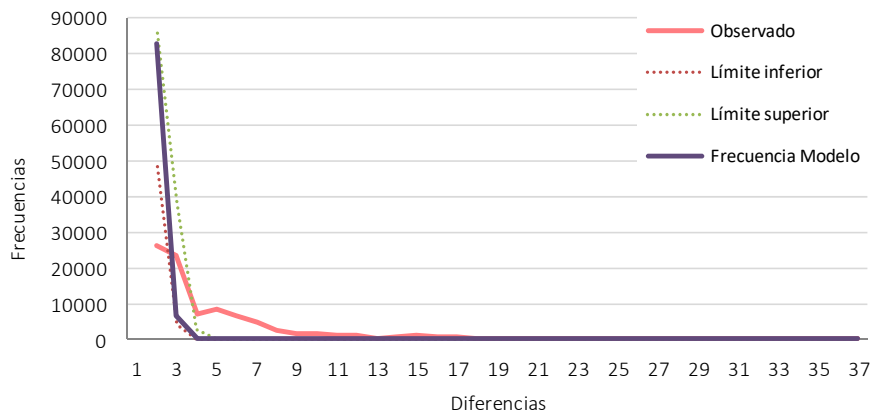
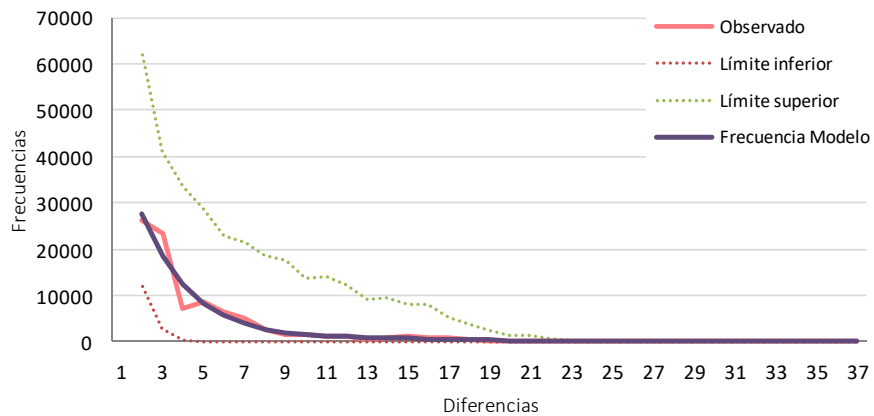
Con el objetivo de probar la hipótesis de si las mutaciones observadas en los haplotipos son selectivamente neutrales, se realizaron las pruebas de Tajima (Tajima, 1989) y de Fu (Fu, 1997). En nuestro estudio, los valores significativamente negativos de los test de Tajima ($D=-2,26485$) y Fu ($F_s=-28,60775$) con el gen COI indican una desviación de la neutralidad, debido a un exceso de polimorfismo de baja frecuencia (exceso de haplotipos raros). Como se ha indicado, los valores significativamente negativos se asocian a expansiones recientes.

En el caso del ITS2, los resultados de los test de Tajima ($D= -2,33008$) y de Fu ($F_s= -26,06584$) también fueron significativamente negativos y son el reflejo de un exceso de polimorfismos a frecuencias intermedias, que puede ser una consecuencia de la hibridación entre poblaciones o del crecimiento poblacional.

Respecto al análisis con el COI de distribuciones de diferencias de las frecuencias alélicas (*mismatch distribution*), se obtuvo una curva unimodal con un bajo número de diferencias, indicando un buen ajuste al modelo de expansión espacial y expansión demográfica reciente (Figuras 34A y 34B).

Figura 38. Resultado del análisis de desajuste (mismatch) basado en dos modelos distintos de cambios bruscos en el tamaño poblacional, un cambio rápido en el tiempo (A y C) o un cambio en el espacio (B y D) para los fragmentos de los genes COI (A, B) y ITS2 (C, D)



B**C****D**

En cambio, en el caso del ITS2 sólo el modelo de una expansión en el espacio predijo las frecuencias observadas (Figura 34D), hecho que reforzaría la dinámica descrita por Eritja y cols. (2017) de dispersión acelerada del vector a través de vehículos.

Tabla 19. Resultados de SAMOVA con el gen ITS2

K	F_{CT}	P	Agrupaciones poblacionales
2	0.574	<0.001	(Guipúzcoa), (Barcelona, Gerona, Tarragona, Alicante, Almería, Castellón, Granada, Huesca, Málaga, Mallorca, Murcia, Valencia, Alpes marítimos, Hérault)
3	0.497	<0.001	(Guipúzcoa), (Málaga), (Barcelona, Gerona, Tarragona, Alicante, Almería, Castellón, Granada, Huesca, Mallorca, Murcia, Valencia, Alpes marítimos, Hérault)
4	0.432	<0.001	(Guipúzcoa), (Málaga), (Granada), (Barcelona, Gerona, Tarragona, Alicante, Almería, Castellón, Huesca, Mallorca, Murcia, Valencia, Alpes marítimos, Hérault)
5	0.386	<0.001	(Guipúzcoa), (Málaga), (Granada), (Huesca), (Barcelona, Gerona, Tarragona, Alicante, Almería, Castellón, Mallorca, Murcia, Valencia, Alpes marítimos, Hérault)
6	0.345	<0.001	(Guipúzcoa), (Málaga), (Granada), (Huesca), (Tarragona), (Barcelona, Gerona, Alicante, Almería, Castellón, Mallorca, Murcia, Valencia, Alpes marítimos, Hérault)
7	0.301	<0.001	(Guipúzcoa), (Málaga), (Granada), (Huesca), (Tarragona), (Castellón), (Barcelona, Gerona, Alicante, Almería, Mallorca, Murcia, Valencia, Alpes marítimos, Hérault)
8	0.264	<0.001	(Guipúzcoa), (Málaga), (Granada), (Huesca), (Tarragona), (Castellón), (Alpes marítimos), (Barcelona, Gerona, Alicante, Almería, Mallorca, Murcia, Valencia, Hérault)
9	0.238	<0.001	(Guipúzcoa), (Málaga), (Granada), (Huesca), (Tarragona), (Castellón), (Alpes marítimos), (Hérault), (Barcelona, Gerona, Alicante, Almería, Mallorca, Murcia, Valencia)
10	0.219	<0.001	(Guipúzcoa), (Málaga), (Granada), (Huesca), (Tarragona), (Castellón), (Alpes marítimos), (Hérault), (Almería), (Barcelona, Gerona, Alicante, Mallorca, Murcia, Valencia)
11	0.183	<0.001	(Guipúzcoa), (Málaga), (Granada), (Huesca), (Tarragona), (Castellón), (Alpes marítimos), (Hérault), (Almería), (Valencia), (Barcelona, Gerona, Alicante, Mallorca, Murcia)
12	0.152	<0.001	(Guipúzcoa), (Málaga), (Granada), (Huesca), (Tarragona), (Castellón), (Alpes marítimos), (Hérault), (Almería), (Valencia), (Barcelona, Gerona, Alicante, Mallorca, Murcia)

K= n° de grupos, F_{CT}= proporción de la varianza genética total debida a la diferencia entre grupos

Primeras detecciones: 2004: Barcelona; 2005/2009: Alicante, Alpes Marítimos, Tarragona; 2008: Gerona; 2010: Castellón; 2011: Murcia, Hérault; 2012: Mallorca; 2013: Valencia; 2014: Almería, Granada, Málaga, Guipúzcoa; 2015: Huesca.

Los análisis de la SAMOVA con el ITS2 (Tabla 19) destacaron que la mejor partición de la diversidad genética se obtenía cuando las 12 provincias se agrupaban en 2 subgrupos (F_{CT}= 0,574, P<0,001) en los que se separan las muestras de Guipúzcoa de las del resto de España, sugiriendo una introducción independiente de la ocurrida en la costa Mediterránea.

Si observamos el resto de las agrupaciones poblacionales, la diversidad genética mayor no ocurre entre regiones distantes geográficamente. En el caso de Granada y Málaga, provincias muy próximas la una a la otra y conectadas por un eje importante de carreteras, están separadas en dos grupos distintos con un F_{CT} significativo igual a 0,432, hecho que podría explicarse por procesos de dispersión distintos. Cabe destacar que las provincias que se separan primero por grupos independientes son las de reciente detección, quedando agrupadas aquellas derivadas de la dispersión por la vertiente mediterránea, incluyendo las muestras del sureste de Francia, por lo tanto parece reflejar una cierta señal temporal y espacial de la expansión de *Ae. albopictus* por España.

II.4. Discusión

Este estudio ha permitido caracterizar mediante la combinación de dos marcadores moleculares diferentes la estructura genética de las poblaciones de *Ae. albopictus* detectadas en España tras varios años de procesos dispersivos. Los resultados obtenidos han permitido constatar que la diversidad genética (π , Hd) del gen mitocondrial COI es mucho menor que la obtenida con el gen ribosomal ITS2, coincidiendo con estudios previos en otros países (Aguirre-Obando y Navarro-Silva., 2017).

La relativamente baja variabilidad genética del marcador COI es, sin embargo, la esperada por un marcador codificante como es este gen mitocondrial, siendo aproximadamente de 2-4% por cada millón de generaciones (e.g. número de Brower; Brower 1994). Teniendo presente la extraordinaria tasa de dispersión de esta especie, el hecho de observar una baja diversidad genética implica directamente que el número de haplotipos que han colonizado el mundo es reducido. Por el mismo motivo, la detección de distintos haplotipos en nuestro conjunto de datos sería consistente con la hipótesis de que en España han ocurrido (o están ocurriendo) múltiples episodios de colonización. Los bajos niveles de diferenciación genética pueden ser atribuidos a una rápida expansión de los haplotipos mediante el transporte a través de vehículos, un modo pasivo de dispersión que Lucientes-Curdi y cols. (2014) sugieren que ocurrió en España a través de la autopista del Mediterráneo (Collantes y cols., 2015). Recientemente, Eritja y cols. (2017) por primera vez han encontrado evidencias, con datos específicos de capturas en vehículos privados, de que existe un flujo de mosquitos asociado a este medio de transporte y que este proceso ha acelerado considerablemente la dispersión de la especie en España. Estimaron la probabilidad de introducción o exportación de mosquitos tigre desde y a las distintas provincias españolas, siendo Alicante, Murcia, Málaga y Barcelona las que transportan con mayor probabilidad mosquitos tigre en los vehículos. Entonces, los haplotipos más abundantes en esas provincias son los que mayor probabilidad tienen de ser exportados, aumentando su frecuencia en los lugares de destino y disminuyendo así la diversidad genética. Esta hipótesis explicaría la frecuencia del H2 presente en todas las provincias estudiadas. Cabe también mencionar que el tamaño y la frecuencia de los propágulos pueden influir en el éxito del establecimiento de una nueva población así

como modificar, mediante hibridación, la estructura genética de las poblaciones ya establecidas en la zona. Considerando que el mosquito tigre de forma natural no suele desplazarse grandes distancias, la dispersión en España probablemente ha tenido lugar mediante dos tipos de procesos, la difusión y el salto dispersivo. La difusión es una expansión local y progresiva, con velocidad de dispersión baja que limita el flujo genético. El salto dispersivo representa dispersión rápida y a larga distancia mediada por transportes que produce un intercambio genético intenso.

De este modo, puede haber toda una gradación de probables diferencias entre una nueva población generada por difusión, donde será prácticamente igual al origen, a las del salto dispersivo donde se producirán efectos fundador más o menos marcados. Cuando se trate de nuevas fundaciones a partir de huevos adheridos a neumáticos u otros materiales, se pueden combinar descendientes de varias hembras. Pero si la nueva población proviene de una sola hembra fecundada en origen, que llega transportada por un vehículo, la diversidad se reduce notablemente. Si porta los alelos más frecuentes en origen tendrá cierta similitud con éste, pero la diferencia puede ser enorme si se trata de una hembra con los alelos más raros del origen. En nuestras muestras, hemos encontrado numerosos haplotipos únicos de baja frecuencia, que sugiere que o bien éstos no llegan a fijarse en las poblaciones y por lo tanto desaparecen, o no lo hacen con suficiente intensidad como para permitir ser detectados varios años o ser exportados a distintos puntos de la geografía española, aumentando así su frecuencia haplotípica en la zona. Sin embargo, la aparición de haplotipos raros puede también deberse a introducciones continuas de ejemplares genéticamente dispares (Kamgang y cols., 2011; Beebe y col., 2013; Zawani y cols., 2014; Ismail y cols., 2015; Manni y cols., 2015) como se ha observado que ocurre en Guipúzcoa. En el caso concreto del gen COI, surge una problemática descrita por algunos investigadores que explica una pérdida de variabilidad importante debida a la infección de los mosquitos por la bacteria endosimbionte *Wolbachia*, que causa incompatibilidad citoplasmática, feminización y distorsión de la *sex-ratio* de las poblaciones (de Albuquerque y cols., 2011; Minard y cols., 2015). Un estudio reciente ha descrito que las poblaciones de *Ae. albopictus* recogidas en Cataluña muestran una superinfección por distintas cepas de este endosimbionte (100% de los ejemplares positivos (Talavera y cols., 2017)), hecho que podría ser el motivo por el cual la Hd del COI no es mayor.

Sin embargo, el estudio con el ITS2, ha permitido detectar un mayor polimorfismo en nuestras muestras. La elevada diversidad genética de este fragmento de ADN puede explicarse como resultado de que es una zona del ADN nuclear no codificante y, por tanto que debido a su baja presión de selección presenta a menudo una elevada tasa de mutación (Song y cols., 2012). A diferencia del COI, la alta diversidad de haplotipos del ITS2 podrían derivar de un proceso de generación *in situ* de nuevos haplotipos a partir de procesos mutacionales ocurridos y fijados a partir de los distintos eventos de colonización y aislamiento. Estudios previos han mostrado una diferenciación de las poblaciones (grupos de individuos) o de los propios individuos entre sí dentro de una misma población, hecho que Delatte y cols. (2013) describieron en Isla Reunión. Más tarde Manni y cols. (2015) observaron algo similar con muestras

procedentes de Tailandia e Italia. Así, el ITS2 en esta especie puede utilizarse como un indicador de la variabilidad genética posterior a la colonización.

El análisis de la varianza molecular del ITS2 a nivel espacial (SAMOVA) ha permitido evidenciar que las poblaciones de Guipúzcoa, son significativamente diferentes de otro gran grupo que muestra mayor afinidad genética entre las provincias conectadas por el eje mediterráneo. Este patrón sugiere que (a) muy probablemente fueron introducidas en el País Vasco por carretera desde Francia y que (b) el flujo génico entre las poblaciones mediterráneas es mucho más intenso. Sin embargo considerando todo el conjunto del análisis de la varianza molecular, las similitudes genéticas entre provincias dentro de los grupos (K) no se relacionan con la proximidad geográfica de las mismas como, también observaron Manni y cols. (2015) con el ITS2 y, recientemente, otros autores con microsatélites y SNPs (Maynard y cols., 2017; Kotsakiozi y cols., 2017).

Tras el estudio de la red de haplotipos internacional, los dos genes han sido informativos representando cierta afinidad de las poblaciones españolas con otras a nivel mundial. A pesar de la relativa baja diversidad genética del COI, hemos podido relacionar poblaciones de Gerona, Barcelona y Málaga con algunas de Madagascar e Isla Reunión, sugiriendo que la introducción de nuevos ejemplares puede tener lugar a través de las principales ruta marítimas comerciales. Es un hecho relevante si se considera el hecho de que los puertos de Barcelona, Valencia y Algeciras se sitúan entre 30 principales puertos del mundo según la revista especializada Lloyd's List (2016). La presencia española en Madagascar se relaciona con la flota pesquera que faena en sus aguas al amparo del acuerdo de pesca con la UE. La flota atunera cerquera comunitaria opera en el Océano Índico (principalmente española, francesa y portuguesa), especialmente en la época de pesca en el Canal de Mozambique (marzo a mayo) (Ministerio de Asuntos exteriores, 2017)

En los últimos años, a consecuencia de la fuerte expansión geográfica experimentada a escala mundial por *Ae. albopictus*, se han sucedido numerosos trabajos de investigación tratando de ahondar en el conocimiento de la estructura genética y la historia demográfica de la especie a nivel global. Paralelamente, se ha producido un cambio en el orden económico mundial y las grandes potencias (EEUU y Canadá, Europa, Australia, Nueva Zelanda, Japón y Corea del Sur), perdieron parte de su liderazgo para dejar lugar a las potencias emergentes como Brasil, Rusia, India y China, así como potencias emergentes secundarias como Sudáfrica, y sudeste asiático (www.bancomundial.org). Siendo a menudo relacionados los procesos de dispersión de especies exóticas invasoras con los procesos de globalización, cabría la posibilidad de que la aceleración del proceso dispersivo del mosquito tigre a escala global, hubiera sido una consecuencia del aumento de exportaciones comerciales desde su área nativa. Los primeros trabajos sobre los orígenes de las poblaciones de *Ae. albopictus* por el mundo, describieron una baja diversidad genética en el área nativa de la especie (Goubert y cols., 2016). Estos datos posteriormente se atribuyeron al tipo de muestras utilizadas para los análisis, en ocasiones líneas criadas en laboratorio, así como por el

tipo de marcador. Con la utilización de nuevas técnicas moleculares y la ampliación del número y tipo de muestras de diferentes orígenes, se obtuvo una visión más adecuada de la variabilidad genética de esta especie invasora. En Asia, Porretta y cols. (2012) y más tarde Zhong y cols. (2013) mostraron una elevada diversidad genética de las poblaciones de mosquito tigre con una reducida estructura genética. En otras palabras, plantearon el hecho de que hubiera tenido lugar un proceso de expansión progresiva de poblaciones genéticamente diferentes pero interconectadas que podrían estar en el origen de la estructura genética actual en el área continental nativa de esta especie. Más tarde, Battaglia y cols. (2016) identificaron cinco *clusters* de poblaciones asiáticas, aunque sólo tres de ellos estaban implicados en los procesos de dispersión a nivel global.

Por otro lado, algunos trabajos antropológicos realizados con muestras de Isla Reunión, Madagascar y otras islas del Océano Indico, asociaron la introducción de *Ae. albopictus* a través del comercio de especias desde Asia durante el siglo XVIII (Delatte y cols., 2011). Manni y cols. (2017) diferencian dos poblaciones italianas, una relacionada con Norte América y la otra con Isla Reunión. Ninguna de las secuencias obtenidas de muestras en España, muestran afinidad con EEUU pero si con Italia e Isla Reunión. Concretamente cuatro de los ocho haplotipos compartidos lo son con Isla Reunión, Tailandia e Italia. Emilia-Romaña, situada en la costa oeste del mar Adriático, tiene un importante puerto (Ravenna) con intenso intercambio comercial con Isla Reunión y Mauricio, por lo que no se puede excluir la hipótesis de que la introducción de ejemplares tenga lugar a través de esta vía (<http://www.cargorouter.com>). Por otro lado, la detección de un haplotipo que se comparte únicamente entre muestras de Mallorca y de Italia, así como otro haplotipo únicamente repartido entre España y Grecia, sugieren también la posibilidad de la introducción a través de ferris (Barceló y cols., 2015). Otros autores (Manni y cols., 2017; Kotsakiozi y cols., 2017) observaron diferencias entre las poblaciones de Italia y las de Grecia y sugieren que en Europa se produjeron al menos dos frentes de invasión por parte de mosquitos con genotipos diferentes.

A nivel intracontinental, como hemos señalado anteriormente existen evidencias de que la dispersión en España se produce siguiendo los principales ejes de carreteras. También en Europa se han descrito procesos similares (Becker y cols., 2013; Medlocky cols., 2017) y esto podría explicar la gran afinidad de las secuencias encontradas en España con las de Francia e Italia.

La evidencia de poblaciones que permanecen activas todo el año en España (Collantes y cols., 2014) podría encontrar explicación en genotipos tropicales o subtropicales de algunas poblaciones. De hecho, considerando nuestros resultados, aparentemente en España existe una combinación genotípica de poblaciones templadas (Francia, Italia, Grecia y Japón), subtropicales (Madagascar e Isla Reunión) y tropicales (Tailandia). A pesar de que la diapausa fotoperiódica, tiene una base genética demostrada y parece ser un componente importante de la adaptación climática y del éxito invasivo (Urbanski y cols., 2012; Poelchau y cols., 2013) no se puede descartar que

exista flujo genético entre las poblaciones de orígenes tropical y templado. De hecho, Maynard y cols. (2017) sugieren que las poblaciones de isla Reunión descienden de poblaciones ancestrales de origen templado, lo que explicaría que se detectasen en Europa haplotipos comunes con estas islas. Pero un reciente estudio ha demostrado la ausencia de flujo génico contemporáneo entre poblaciones europeas e isla Reunión. Sugieren que las establecidas en las islas del Océano Índico no están adaptadas a las condiciones climáticas europeas y por lo tanto a pesar de ser introducidas, no consiguen establecerse y, por lo tanto sus genotipos no llegan a fijarse entre los europeos (Sherpa y cols., 2018). Sin embargo Battaglia y cols. (2016) señalan la posibilidad de que los distintos genotipos ancestrales coexistan en la actualidad en muchas de las zonas recientemente colonizadas y que hayan surgido nuevas combinaciones genómicas que podrían ser una de las causas de la creciente capacidad invasora de *Ae. albopictus*.

Debido a la importancia epidemiológica y también a su estatus de especie invasora, *Ae. albopictus* debería ser considerado una especie modelo de invasión exitosa. Sin embargo, muchos investigadores sugieren que se debería estandarizar los métodos de muestreo y de genotipificación para evitar la dispersión de datos que finalmente resultan irrelevantes para la inferencia global. La disponibilidad de marcadores más informativos (micro-Satélites, SNPs) y grandes colecciones de muestras, incluyendo diferentes periodos de tiempo, haría posible la investigación y modelización de rutas de invasión (Cristescu, 2015) y el estudio integral de la estructuración genética del vector a nivel global. La reciente secuenciación del genoma completo de *Ae. albopictus* (Dritsou y cols., 2015; Chen y cols., 2015) está aportando información acerca de la localización de marcadores ya existentes. Probablemente, permitirá diseñar nuevos marcadores para el estudio de la estructura genética de esta especie, considerando variaciones geográficas y temporales de la misma.

III. Susceptibilidad de *Aedes albopictus* a la infección por hongos entomopatógenos.

III.1. Introducción

Históricamente, las campañas de control de mosquitos estaban enfocados hacia la eliminación de las fases larvianas mediante la gestión ambiental, aplicación de inhibidores del crecimiento o juvenoides, Bti, depredadores naturales, etc., dejando durante años como única herramienta de control de adultos la utilización de insecticidas químicos convencionales que, en la Unión Europea sólo pueden ser piretroides (<http://echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals/biocidal-active-substances>). El uso indiscriminado de ciertos de estos productos ha derivado en la contaminación ambiental, toxicidad de algunos productos para los humanos y otros organismos beneficiosos, además de la aparición de resistencias. Todo ello ha puesto en evidencia la necesidad de nuevas estrategias de control integrado que contribuyan, de una forma sostenible, al control de vectores de enfermedades emergentes en Europa como son la malaria, el dengue o el chikunguña.

Los hongos entomopatógenos (HE) están demostrando ser una alternativa muy prometedora como método de control de insectos y de mosquitos en particular. Poseen una buena relación coste/beneficio (Lacey y cols., 2001; Scholte y cols., 2004) y otras ventajas como son la capacidad de infectar por contacto (no requieren de la ingestión) con una producción de toxinas durante el proceso de infección que terminan siendo letales para el insecto. Además, la presión de selección de resistencias es menos intensa si la comparamos con la de los insecticidas de acción rápida. De hecho, se prevé que la evolución de resistencias a los hongos sea más lenta que la evolución de las resistencias a insecticidas.

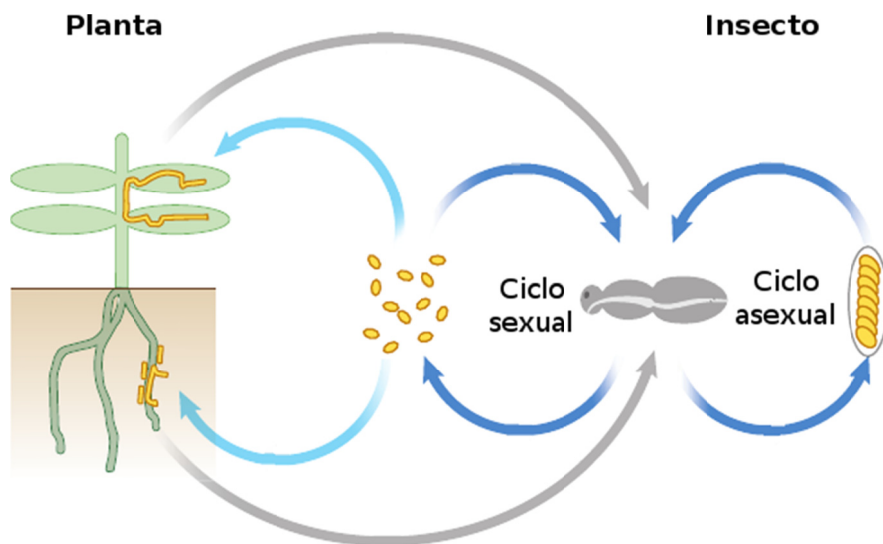
Hay descritas más de 1000 especies de hongos reconocidos como agentes causantes de enfermedades en artrópodos. La gran mayoría de trabajos realizados con hongos se han orientado al control biológico de plagas agrícolas o forestales y, en menor medida, de mosquitos vectores de enfermedades. Los géneros *Lagenidium* Schenk, *Coelomomyces* Kellin y *Culicinomyces* Couch, Romney & B. Rao han sido muy estudiados como patógenos de larvas de mosquitos por su marcada virulencia. No obstante, la aplicación de estas especies de hongos no ha sido exitosa en el biocontrol de mosquitos, porque su ciclo biológico involucra más de un huésped y porque las esporas flageladas son de vida corta y muy susceptibles a la desecación. Este último aspecto dificulta la producción comercial rentable y efectiva. Otros hongos con potencial mosquitocida pertenecen a los géneros *Beauveria* Vuill. y *Metarhizium* Sorokín, pero han sido evaluados básicamente contra las formas larvianas. La mayoría de los conidios son hidrófobos pero los de éstos dos géneros presentan unas hidrofobinas (proteínas que forman una película en la superficie del conidio) que facilitan la adhesión primaria, produciendo una especie de mucosidad (Holder y cols., 2007; Zhang y cols., 2011). Algunos trabajos de control de adultos han mostrado resultados muy prometedores como alternativa de biocontrol, debido a que las micosis pueden causar epizootias que rápidamente diezman las poblaciones. Además, resultan interesantes por el bajo coste de producción en masa y el buen mantenimiento de la virulencia, en condiciones apropiadas de humedad y temperatura. A penas se han descrito efectos nocivos sobre

la mayoría de vertebrados y otros invertebrados debido a su especificidad (Vega y cols., 2012)

La temperatura, humedad ambiental y radiación ultravioleta son factores limitantes que afectan de forma importante a la viabilidad y eficiencia de estos micoinsecticidas en condiciones naturales (Scholte y cols., 2004).

Los HE pueden vivir en forma parasítica sobre los insectos y como endófitos, además de en forma saprofita facultativa, sobre material vegetal en descomposición (Boomsma y cols., 2014) (Figura 38). En el crecimiento saprofita se forman conidióforos que producen conidios y desarrollo micelar, de modo que el hongo puede ser cultivado en el laboratorio utilizando técnicas de producción en masa de bajo costo.

Figura 39. Ciclo de vida de hongos entomopatógenos del orden Hypocreales. Modificado de Boomsma y cols., 2014



III.1.1. Clasificación taxonómica

Los géneros *Beauveria* Vuill. y *Metarhizium* Sorokin, son hongos anamorfos filamentosos facultativos ya que son saprobios e hipogeos que infectan a insectos por medio de conidios resultantes de su reproducción asexual (Humber, 2007). Sus telomorfos, formas sexuales, corresponden con los géneros *Cordyceps* Fr. y *Metacordyceps* G.H.Sung, J.M.Sung, Hywel-Jones y Spatafora, respectivamente (Sung y cols., 2007). Se han mantenido los distintos nombres a pesar de conocerse ahora mediante técnicas moleculares y estudios evolutivos, que son el mismo organismo pero en distintas formas (sexuales y asexuales).

Las especies más representativas y con las principalmente se ha trabajado en control de culícidos, son *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin y *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. Ambas especies son cosmopolitas y ubiquistas, componentes de la microbiota de suelos.

Metarhizium anisopliae

Clasificación taxonómica (Bischoff y cols., 2009)

Reino Fungi

Filo Ascomycota

Clase Deuteromycetes

Orden Hypocreales

Familia Clavicipitaceae

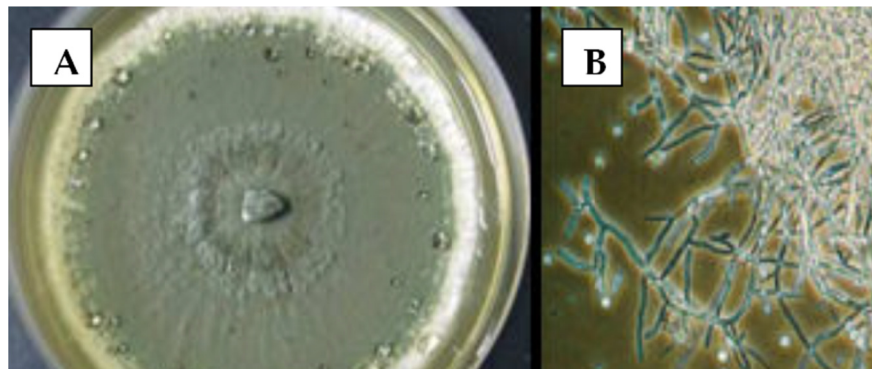
Género *Metarhizium* Sorokin

Especie *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin.

Este hongo tiene un amplio rango de insectos huéspedes en la naturaleza (más de 200 especies), entre las cuales no se encuentran los mosquitos. Sin embargo, se ha visto experimentalmente que pueden ser muy virulentos contra las larvas de culícidos (Scholte y cols., 2004).

La morfología de *M. anisopliae* se caracteriza por ser un micelio verde del que nacen los conidióforos, irregularmente ramificados con dos a tres ramas en cada septo (en racimo), miden de 4 a 14 μ m de longitud x 1,5 a 2,5 μ m de diámetro (Figura 40). Las fiálides son cilíndricas en forma de clava, adelgazadas en el ápice, miden de 6 a 13 μ m de longitud y de 2 a 4 μ m de diámetro. Los conidios son unicelulares, con extremos redondeados y agrupados en cadenas regulares debido a la agregación por elongación, hialinos a verde oliváceo, miden de 3,5 a 9 μ m de longitud x 1,5 a 3,5 μ m de diámetro (Cañedo y Ames, 2004). Los insectos muertos por este hongo son cubiertos completamente por micelio, el cual inicialmente es de color blanco pero se torna verde cuando el hongo esporula (Monzón, 2001).

Figura 40. Morfología macroscópica (A) y microscópica (B) de *M. anisopliae* Pik-Kheng y cols., 2009



Beauveria bassiana

Clasificación taxonómica (Bischoff y cols., 2006)

Reino Fungi

Filo Ascomycota

Clase Sordariomycetes

Orden Hypocreales

Familia Clavicipitaceae

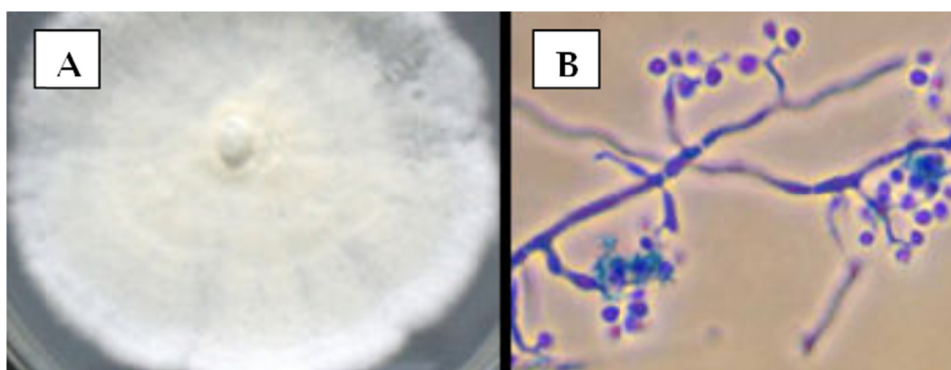
Género *Beauveria* Vuill.

Especie *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill.

Se trata de un hongo con un amplio rango de insectos hospedadores (más de 500 especies sobre todo de coleópteros, lepidópteros y hemípteros). Pocos trabajos reflejan su actividad sobre mosquitos, pero su virulencia sobre larvas de culícidos, hace de *B. bassiana* un candidato interesante para control, sobre todo porque, a pesar de no haberse descrito en la naturaleza sobre adultos de mosquitos, parece ser muy virulenta en ensayos de laboratorio (Scholte y cols., 2003).

La especie *B. bassiana* se caracteriza por presentar colonias en placas de PDA (*Potato Dextrosa Agar*), a los 14-15 días, de color blanco (Figura 41A), de aspecto algodonoso (por la abundancia de conidios) que se vuelve polvoriento y amarillo en el centro. El reverso es rojizo en el centro y amarillento en los bordes. Las células conidiógenas de los conidióforos suelen estar agrupadas en grupos numerosos y compactos (aunque puede haber solitarias). Tienen forma de botellita en cuyo raquis, algo doblado, se generan los conidios. Los conidios son unicelulares, hialinos, esféricos o subesféricos y menores de 3µm de longitud. (Cañedo y Ames 2004, Gerónimo-Torres y cols., 2016).

Figura 41. Morfología macroscópica (A: Echeverría, 2006) y microscópica (B: Luque, 2011) de *B. bassiana*



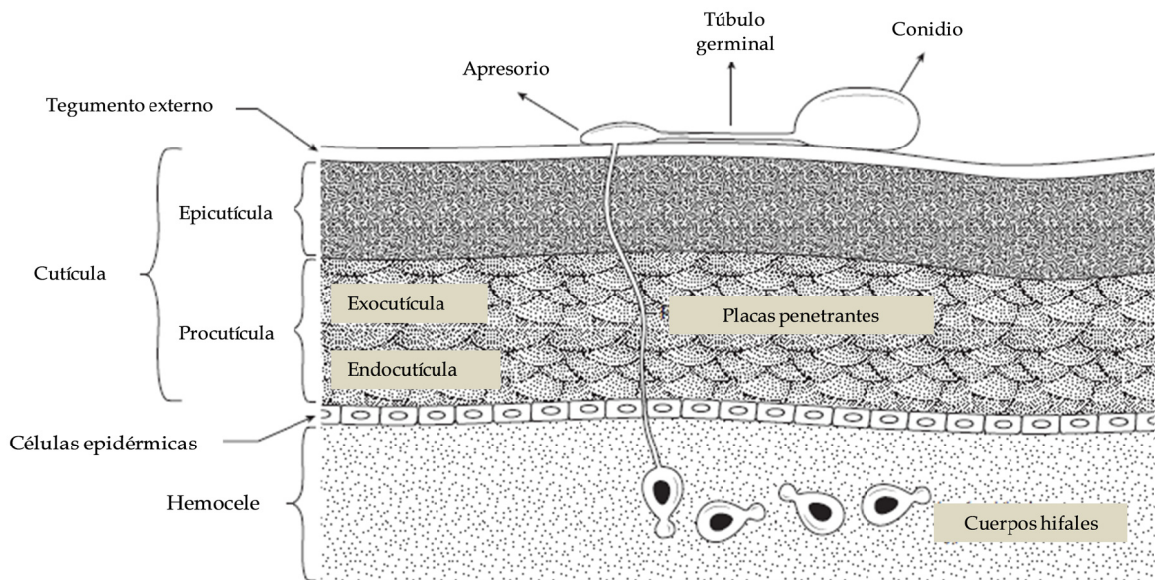
Los insectos infectados por especies de *B. bassiana* presentan una cubierta blanca muy densa formada por el micelio y las esporas del hongo (Habid y Andrade 1977). Gómez (1982) y Alves (1986) señalan que los insectos atacados por este hongo

presentan una sintomatología característica: el cuerpo permanece con su forma normal, pero su interior está lleno de un micelio muy apretado. Las estructuras reproductoras del hongo emergen generalmente a través de las partes blandas del exoesqueleto y le dan el aspecto característico que facilita su clasificación.

III.1.2. Mecanismo de infección

El proceso patogénico se llama micosis y comprende mecanismos tóxicos-mecánicos. Comienza cuando ocurre la adhesión de conidios a la epicutícula del insecto. Se ha sugerido que iones divalentes, como el Ca^{+2} y el Mg^{+2} , reducen las fuerzas de repulsión electrostática de la superficie del insecto, por lo que pueden afectar su hidrofobicidad y promover la adhesión pared celular fúngica-cutícula, creando condiciones favorables para el establecimiento de la espora y la subsecuente invasión del insecto (Pucheta- Díaz y cols., 2006). El hongo penetra a través de la cutícula por acción mecánica y efectos enzimáticos, ya que los conidios forman un tubo germinal que mediante un complejo de exoquitinasas, proteasas y lipasas, digieren azúcares y lípidos de la procutícula (exocutícula y endocutícula) (Boomsma y cols., 2014). Posteriormente, las hifas atraviesan la epidermis y se produce la invasión del hemocele y de otras estructuras del insecto, como tejido muscular, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, etc. El hongo se nutre de la trehalosa de la hemolinfa y secreta toxinas (destruxinas, beuvericinas, etc.) que matan al huésped por inanición, deshidratación y daños mecánicos (Pucheta-Días y cols., 2006).

Figura 42. Estructura y composición de la cutícula de insectos y forma de penetración de hongos entomopatógenos” Modificado de Vega y cols., 2012



Cuando la hifa ha llegado al hemocele, se pueden producir diferentes reacciones de defensa del insecto frente a un cuerpo extraño: fagocitosis, encapsulación celular y formación de compuestos antimicrobianos como las lisozimas, aglutininas y melanización. El hongo debe superar al sistema inmunológico del hospedador antes de

invadir el hemocele y desarrollarse dentro del insecto (Vilcinskas y Götz, 1999; Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013). Si el hongo sobrepasa la defensa inmune del insecto, el insecto empieza a mostrar síntomas fisiológicos, como convulsiones, carencia de coordinación y cambios de conducta (deja de alimentarse o moverse), entra en un estado letárgico y finalmente muere (Alean- Carreño, 2003). La muerte puede ocurrir relativamente rápida o en unos pocos días, dependiendo del grado de infección.

III.1.3. Antecedentes sobre el uso de *M. anisopliae* y *B. bassiana* como biocontroladores de culícidos

Estas dos especies de hongos entomopatógenos son muy efectivas frente a muchos tipos de insectos y, en los últimos años, se ha profundizado en el desarrollo de técnicas que implican la infección de culícidos. La mayoría de estos bioensayos se han realizado con *M. anisopliae* y, en menor medida, con *B. bassiana*.

Los primeros experimentos sobre culícidos con *B. bassiana* fueron realizados sobre larvas y adultos de *Culex tarsalis* Coquillett, 1896, *Culex pipiens* L., 1758, *Anopheles albimanus* Wiedemann, 1820 (Clark y cols., 1968) y *Aedes (Jarnellius) sierrensis* (Ludlow, 1905) (Pinnock y cols., 1973). Posteriormente, Scholte y cols. (2003); indicaron que los adultos de *Anopheles gambiae* Gilles, 1902 también eran susceptibles y morían al ser expuestos a telas con tratamiento fúngico. Aunque recientemente Heinig y Thomas, (2015) vieron un potencial limitado de esta especie de hongo para el control del paludismo. En los últimos años, se han realizado diversos estudios para evaluar su potencial contra *Ae. aegypti* (Paula y cols., 2008; Pereira y cols., 2009; Darbro y cols., 2012). Carolino y cols. (2012) anotaron además sus efectos negativos sobre la fecundidad y el patrón de alimentación.

Por otro lado, el interés por el empleo de *M. anisopliae* resurgió al presentar actividad adulticida contra vectores de malaria y reduciendo la capacidad de transmitir los esporozoitos de *Plasmodium* responsables de desencadenar la enfermedad (Scholte y cols., 2003, 2005, 2008; Blandford y cols., 2005; Thomas y Reed, 2007). Respecto a la mortalidad, se observó un TL₅₀ para *An. gambiae* expuesto a $1,6 \times 10^7$ o $1,6 \times 10^{10}$ conidios/m² es de 9,7 y 5,9 días, respectivamente (Scholte y cols., 2003). Además del porcentaje de mortalidad producida, las hembras infectadas por *M. anisopliae* reducen la ingesta de néctar y de sangre, por lo que presentan menor fecundidad (Scholte y cols., 2006; Blanford y cols., 2012; Ondiaka y cols., 2015) así como menor capacidad de transmitir los esporozoitos de *Plasmodium* (Blanford y cols., 2005).

En relación a los vectores del virus del dengue, los trabajos sobre imagos son escasos y la gran mayoría de trabajos recientes se realizan sobre fases larvarias de *Ae. aegypti* (Santos y cols., 2009; Pereira y cols., 2009; Gomes y cols., 2015) y, puntualmente, sobre *Ae. albopictus* (Bilal y cols., 2012; Lee y cols., 2015). El primer trabajo donde se evaluó la infección sobre ejemplares adultos de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* por *M. anisopliae* fue realizado por Scholte y cols. (2007). Aplicaron $1,6 \times 10^{10}$ conidios/m² sobre una manta de color negro como sitio de reposo para adultos en jaulas. Hubo una mortalidad de 87% en *Ae. aegypti* y de 89% en *Ae. albopictus*. El TL₅₀ fue de 3,1 y 4,1 días

para machos y hembras de *Ae. aegypti*, respectivamente. Para *Ae. albopictus* se obtuvieron los valores respectivos de 17,7 y 19,7 días.

Garza-Hernández y cols., (2015) describen algunos estudios que inducen la infección de hembras por machos de *Ae. aegypti* mediante la cópula. Además, la micosis que se deriva sobre las hembras puede frenar el periodo de incubación extrínseca del virus del dengue (Garza-Hernández y cols., 2013).

III.1.4. Justificación y objetivos

Los hongos entomopatógenos, y más concretamente las especies *M. anisopliae* y *B. bassiana*, poseen varias características que hacen interesante su estudio en campo para el control integrado de mosquitos. La producción y mantenimiento de cultivos a nivel industrial presenta algunas dificultades debido a la sensibilidad de éstos a la variación de las condiciones climáticas como las temperaturas extremas, la desecación y luz ultravioleta (Vega y cols., 2012). Sin embargo, la mayoría de estos inconvenientes pueden ser resueltos mediante la modificación de las formulaciones. Los hongos anamorfos son más recomendables para este tipo de producción debido a que las formulaciones pueden presentarse en spray, polvo o granulado. La aplicación puede hacerse directamente sobre la plaga a tratar o sobre el suelo, las hojas o superficies como mosquiteras (Lacey, 2017). Tienen una persistencia bastante rentable (Paula y cols., 2013). Las formulaciones de base oleosa presentan potencial puesto que mejora la protección de los conidios, facilitan la adherencia a las superficies hidrofóbicas del tegumento de algunos insectos y aumentan la tolerancia de los conidios a las variaciones de los factores abióticos (Carolino, 2012).

Al ser cosmopolitas y componentes naturales de la entomofauna del suelo, no contaminan el medio ambiente, poseen una gran especificidad y, por lo tanto, un menor riesgo frente a organismos beneficiosos que los insecticidas convencionales y no afectan a vertebrados, incluido el hombre. Por todo ello, los HE han sido clasificados como sustancias de bajo riesgo (Chandler, 2017).

Además, su modo de acción por contacto es muy ventajoso y les diferencia de otros agentes biológicos como bacterias, virus, nematodos o protozoos que requieren de la ingestión para ser efectivos. El contagio de un tarso con conidios basta para infectar todo el cuerpo del mosquito (Scholte y cols., 2007). De forma general, los insecticidas biológicos no suelen matar instantáneamente, pero se ha descrito que la sinergia de HE con insecticidas (Farenhorst y cols., 2010) o aceites vegetales (Gomes y cols., 2015) puede contribuir a medio o largo plazo a reducir las densidades poblacionales de mosquitos desde el inicio del periodo de actividad de éstos, menguando así la probabilidad de aparición de brotes de enfermedades vectoriales.

La escasez de estudios sobre enemigos naturales frente a *Ae. albopictus* supone una oportunidad para el estudio de los micoinsecticidas como método de biocontrol. Así, este apartado del trabajo corresponde con el objetivo general 4: *Estudio de la*

susceptibilidad de adultos de *Ae. albopictus* a la aplicación de hongos entomopatógenos como método de control biológico, del que se derivan los objetivos específicos:

i. Estudiar por primera vez en España la actividad patogénica de distintas cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre una población de *Ae. albopictus* originaria de Barcelona y mantenida en laboratorio.

ii. Describir los efectos de la infección por hongos entomopatógenos sobre la fecundidad y fertilidad de las hembras de esta especie invasora.

III.2. Material y métodos

III.2.1. Insectos empleados en el estudio

Los ejemplares empleados en este estudio se obtuvieron de la colonia de *Ae. albopictus* libre de patógenos establecida desde 2009 en el Laboratorio de Parasitología y Enfermedades parasitarias de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Estos ejemplares provienen de trampas de oviposición colocadas en Barcelona, en el año 2009. Para la metodología de cría se siguieron los protocolos descritos por Alarcón-Elbal y cols. (2010).

Para la selección de adultos, diariamente se recogieron las pupas en botes que se mantuvieron en el interior de jaulas entomológicas (BugDorm-1 Insect cage) de 30x30x30 cm. Con el fin de tener un control de la edad de los imagos, cada dos días se retiraron los botes con las exuvias y las pupas restantes, de modo que los adultos de las jaulas tenían edades concretas y similares para los bioensayos.

Los mosquitos se mantuvieron en una cámara climatizada a una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $80\pm 5\%$ y fotoperiodo 12/12 mediante el uso de iluminación artificial fluorescente con lámparas de luz blanca de 40W. Se les proporcionó una solución azucarada al 10% *ad libitum*.

III.2.2. Hongos empleados en el estudio

Los hongos estudiados como posibles agentes de control pertenecen a dos de las especies fúngicas más representadas dentro del ámbito de los bioplaguicidas. Se trabajó con cuatro aislados de *Beauveria bassiana* y uno de *Metarhizium anisopliae* (Tabla 19); todas ellas pertenecientes a la Colección de Hongos Entomopatógenos del Centro de Ecología Química Agrícola de la Universidad Politécnica de Valencia.

Cada cepa fue sembrada en placas Petri con *Potato Dextrosa Agar* (PDA) como medio de cultivo y se incubó a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad durante 15-16 días.

Tabla 20. Aislados de las especies de hongo empleadas para los estudios

Hongo	Nombre	Aislamiento
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>rf</i>	<i>Rhynchophorus ferrugineus</i> Olivier, 1790
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>tom1</i>	<i>Tomicus destruens</i> (Wollaston, 1865)
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>tom2</i>	<i>Tomicus destruens</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>bbcom</i>	Adquirido comercialmente
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>ma</i>	Edáfico

Los conidios fueron cosechados y suspendidos en una solución estéril de polisorbato 80, *Tween 80*, (0,02%) en agua destilada. Posteriormente, se centrifugó la suspensión a 3.600 rpm durante 5 min. Tras descartar el sobrenadante, se realizó un recuento para el cálculo de la concentración de conidios en cámara de Neubauer (Hausser Scientific®, Horsham, PA) utilizando un microscopio en objetivo 40X (Nikon Eclipse 80i). Finalmente, la dosis experimental para los ensayos se ajustó a 1×10^9 conidios/ml. La suspensión control fue una solución de *Tween 80* (0,02%) y agua destilada sin conidios.

III.2.3. Puesta a punto de los bioensayos

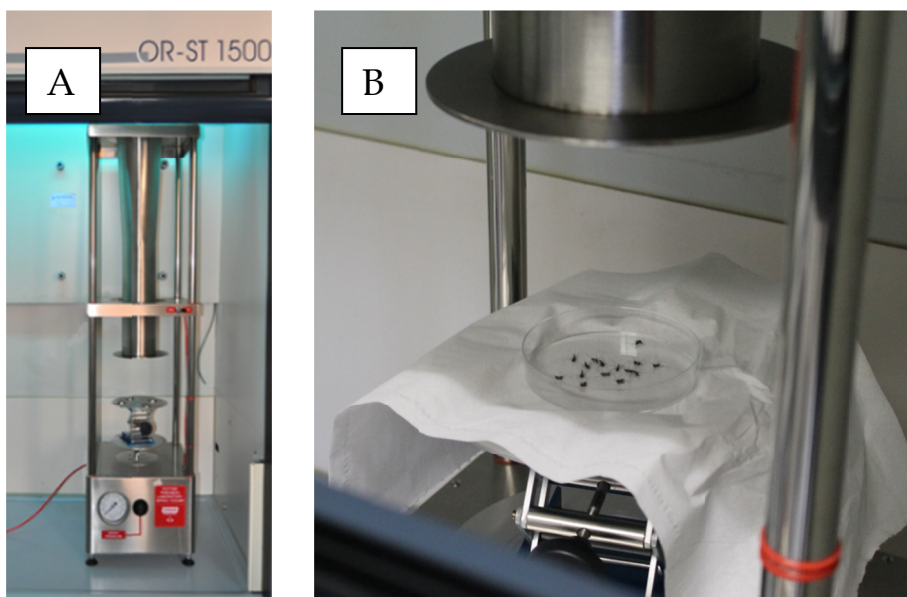
Las aplicaciones de las distintas cepas de hongos se realizaron utilizando una torre de Potter para pulverizaciones de precisión (Potter, 1952), dispuesta en una cámara de extracción con sistema de esterilización por medio de luz ultravioleta germicida (λ 254 nm).

Previamente a las pulverizaciones sobre mosquitos, se realizaron una serie de controles de pesada, de esterilidad y concentración como se detalla a continuación.

Para tener una mayor constancia de las condiciones de trabajo, se estableció el protocolo de trabajo con la torre de Potter:

- Se dispuso que la placa Petri se encontrara a una distancia de 10 cm (en posición de trabajo).
- Se utilizó un volumen de 2 ml para cada pulverización y una presión de aire de 15 psi. Esta presión se consiguió mediante un compresor de aire Burkard, modelo 0523-703 Q-R32 X.
- Con estas condiciones, sobre la plataforma de pulverización se aplicó un peso de pulverizado de aproximadamente 300 mg. La realización de un control de pesada antes de cada ensayo mediante la pulverización de 2 ml de *Tween 80* (0,02%) sobre placa de Petri permitió evaluar la cantidad exacta pulverizada y de esta forma descartar errores.

Figura 43. A: Torre de Potter. B: Zona de pulverización sobre la placa Petri



Antes de realizar los ensayos con una nueva cepa de hongo se limpió exhaustivamente la torre de Potter mediante varios pases de agua, agua con jabón y alcohol. Posteriormente se mantuvo la cabina de extracción con la torre de Potter en su interior, sometida a luz ultravioleta germicida durante 1h30, para la esterilización de la sala y del material a emplear en el siguiente bioensayo.

Antes de cada bioensayo, para tener certeza de que no había contaminación residual en la torre de Potter, se pulverizó 2 ml de *Tween 80* (0,02%) en placas de PDA que fueron incubadas en estufa a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad. A las 96h se observó si había crecimiento de algún agente contaminante, bien bacteriano o fúngico que pudiera falsear los resultados del estudio.

Por último, se realizó el control de concentración mediante la pulverización de 2 ml de suspensión de cada cepa de hongo a 10^2 y 5×10^2 conidios/ml sobre placas con PDA. Se incubaron a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad y se contó manualmente el número de colonias. Esta valoración de la concentración permitió, además, evaluar el porcentaje de viabilidad de las esporas empleadas en cada experimento.

Se realizaron varias pruebas previas para determinar las condiciones más adecuadas para la sedación con éter de los insectos. Tras probar distintos tiempos de exposición, así como cantidades de éter, finalmente se consideró que las condiciones que menos afectaban a la supervivencia y comportamiento de los mosquitos eran mediante anestesia en un tubo de ensayo de vidrio con 20 μl de éter empapado en algodón durante 45 segundos, tiempo suficiente para que los mosquitos queden sedados durante aproximadamente cinco minutos.

III.2.3.1. Bioensayo 1: Susceptibilidad de *Ae. albopictus* a los hongos entomopatógenos.

Se realizaron tres repeticiones de cada ensayo por cepa de hongo. Los controles fueron mosquitos pulverizados con *Tween* 80 (0,02%) sin hongo. Los testigos fueron mosquitos del mismo lote a los que no se les realizó ninguna manipulación.

Las inoculaciones se hicieron por pulverización con torre de Potter (2 ml de 1×10^8 conidios/ml) sobre una placa Petri de 9 cm de diámetro con aproximadamente 16 hembras adultas de *Ae. albopictus*, de 5-6 días de edad, sólo alimentadas con solución azucarada (Figura 44).

Figura 44. Detalle de la pulverización sobre los mosquitos



Posteriormente, se introdujeron los ejemplares en recipientes de plástico de 5,5 cm de diámetro y 14 cm de alto para que fueran despertando progresivamente. Se les proporcionó una solución azucarada al 10% *ad libitum*. Los botes se mantuvieron en una cámara climática a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 5\%$ HR y fotoperiodo de 16:8h.

Figura 45. Detalle de *M. anisopliae* sobre una hembra de *Ae. albopictus*



Figura 46. Detalle de *B. bassiana* sobre una hembra de *Ae. albopictus*



Se realizó un seguimiento diario registrando la mortalidad a lo largo de 15 días. Para evitar contaminación, se retiraron diariamente los cadáveres de los mosquitos (Figuras 45 y 46). Se sembraron en una placa Petri de 5 cm de diámetro con un papel de filtro húmedo y se incubaron en estufa a 26°C para confirmar el crecimiento micelar.

III.2.3.2. Bioensayo 2: Efecto de la infección fúngica sobre la fecundidad y fertilidad de hembras de *Ae. albopictus*

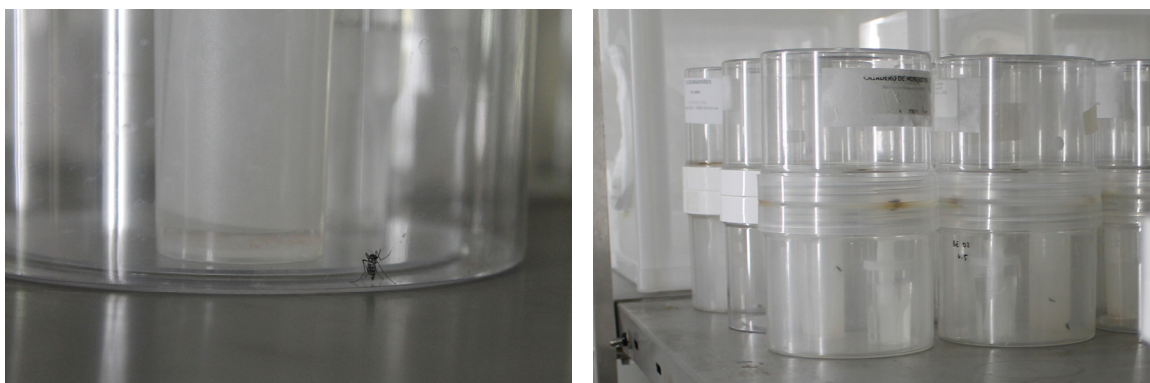
Por otro lado, también se realizaron pulverizaciones de precisión (torre de Potter, 2 ml a 5×10^8 conidios/ml) con el fin de evaluar el efecto de la infección por hongos sobre la fecundidad y fertilidad de las hembras de *Ae. albopictus*. Se anestesiaron con éter hembras copuladas, de 7 días de edad, alimentadas con sangre a través de membrana de pollo 24 horas antes de los tratamientos, mediante la utilización del sistema Hemotek® 5W1 (Discovery Workshops, Accrington, Lancashire, UK). Se empleó sangre de perros control negativo procedentes del proyecto 2011/0093, aceptado por la comisión ética de la Universidad de Zaragoza. La extracción se llevó a cabo en vena cefálica o yugular y almacenada en tubos con heparina-litio (HL).

Se emplearon 15 hembras por tratamiento y cada una de ellas fue individualizada en un eclosionador (recipiente de plástico transparente de 9,2 cm de diámetro x 20 cm de altura) en el cual se dispuso un recipiente con una solución azucarada al 10%. Se introdujo un bote de plástico (3 cm de diámetro x 6cm de altura) con una tercera parte de agua y en cuya superficie interna se colocó una pieza de papel de filtro sobre el cual la hembra pudiera realizar la puesta de huevos (Figura 47).

Se realizó un seguimiento diario de la mortalidad de las hembras, así como un recuento de los huevos depositados en el papel por cada hembra durante 5 días.

Tras el recuento de huevos, cada pieza de papel se mantuvo en un recipiente cerrado para finalizar el proceso de embriogénesis (aproximadamente 7 días). Posteriormente, se sumergieron en agua los papeles con los huevos adheridos. Se emplearon cubetas de plástico de 11 x 7,5 x 4 cm para el desarrollo de las fases acuáticas y eclosión hasta adulto.

Figura 47. Eclosionadores con las hembras tratadas aisladas en su interior



III.2.4. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico IBM SPSS V19.0.1 para Windows (SPSS, 2010).

Para determinar el efecto del tratamiento con hongos sobre hembras de *Ae. albopictus* se realizó un análisis de supervivencia, que tiene como objetivo inferir el tiempo que le ocurre un suceso a un organismo, no siempre la defunción, (en este caso, la muerte de los mosquitos sometidos a tratamiento) en relación a diversos factores naturales o inferidos.

Para ello, se empleó el estimador de Kaplan-Meier y se calcularon las curvas de supervivencia y el tiempo medio de supervivencia. Para hacer la comparación de curvas de supervivencia entre los distintos tratamientos a lo largo del estudio se realizaron las pruebas de log-rank (Mantel-Cox) y Breslow (Wilcoxon-Gehan-Breslow). Para identificar subgrupos homogéneos de medias que no difieren entre sí, se realizaron las pruebas de rango *post-hoc* y para realizar comparaciones múltiples por parejas se realizó el test de Duncan. Para estimar las diferencias entre tratamientos sobre la fertilidad y fecundidad de las hembras, se llevó a cabo una prueba Chi-cuadrado. Para comparar el número de huevos ovipositados por cada grupo de hembras tratado se realizaron las pruebas *t* de student y U de Mann-Whitney (prueba de suma de rangos Wilcoxon), así como la prueba de Kruskal-Wallis para comparar el porcentaje de eclosión de huevos. Por último, la virulencia de las diferentes cepas se estableció en función de los parámetros Tiempo Letal 50 (TL₅₀) y TL₉₀ (tiempo transcurrido hasta que el 50% y 90% de los individuos mueren), los cuales se estimaron mediante análisis Probit (Throne y cols., 1995) con niveles de significación de $p < 0,001$.

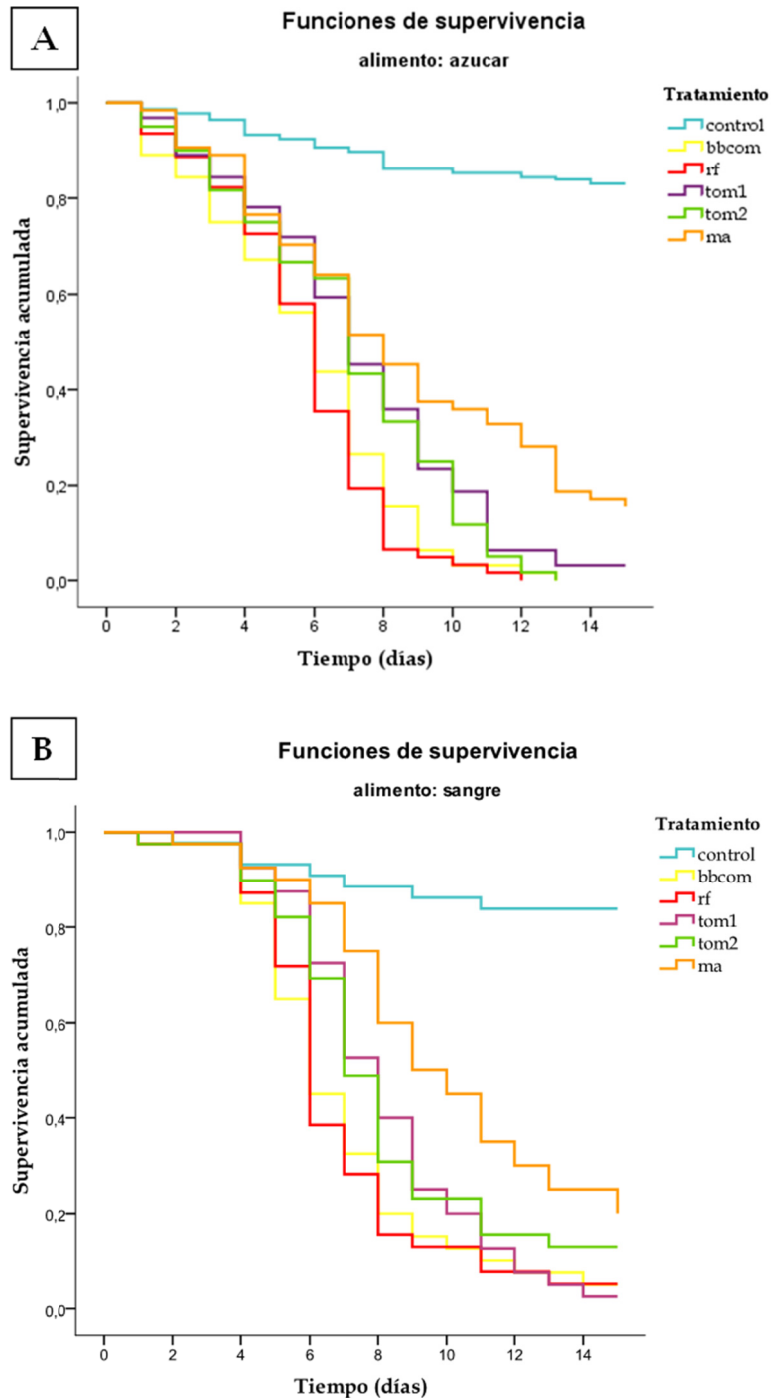
III.3. Resultados

El 100% de los mosquitos empleados como testigos sobrevivieron más allá de los 15 días que duraron los experimentos, descartando así problemas de base en las poblaciones de mosquitos empleadas para las pruebas.

III.3.1. Bioensayo 1: Mortalidad inducida por los hongos entomopatógenos

La Figura 48 muestra las curvas de supervivencia de los mosquitos tratados con las diferentes cepas de hongos. Las hembras sometidas al tratamiento control sobrevivieron significativamente más tiempo que las hembras tratadas con las distintas cepas de hongos, independientemente del tipo de alimentación recibida (azúcar o sangre) ($P_{KM} < 0,001$, para todas las combinaciones por parejas).

Figura 48. Supervivencia acumulada de los mosquitos en función del tipo de tratamiento recibido. A. alimentados con azúcar; B. alimentados con sangre



No obstante, sí que se observó que la mortalidad era algo menor en el grupo alimentado con sangre aunque los resultados no fueron estadísticamente concluyentes (Tabla 21).

Tabla 21. Mortalidad total (%) y supervivencia (media \pm ES) calculada en base diaria a continuación de la exposición de los mosquitos (con distinto régimen alimenticio) a los distintos aislados de *M. anisopliae* y *B. bassiana*

Tratam.	♀ alimentadas con azúcar				♀ alimentadas con sangre				
	Supervivencia		n	Mort.	Supervivencia		n	Mort.	
control	13,531 \pm 0,238	A a	224	16,96%	13,576 \pm 0,522	A a	45	15,55%	
ma	8,593 \pm 0,551	B b	64	84,38%	10,075 \pm 0,588	B b	40	80,00%	
<i>B. bassiana</i>	tom1	7,219 \pm 0,412	C b	64	96,88%	8,175 \pm 0,418	C e	40	97,50%
	tom2	6,917 \pm 0,401	C b	60	100,00%	8,159 \pm 0,543	C ce	40	85,00%
	bbcom	5,719 \pm 0,355	D c	64	100,00%	6,975 \pm 0,475	C cd	40	95,00%
	rf	5,661 \pm 0,299	D c	62	100,00%	6,850 \pm 0,453	C d	40	92,50%

La supervivencia media (en días) se calculó mediante el análisis de Kaplan-Meier. Los valores seguidos de la misma letra indica que los resultados no fueron significativamente diferentes cuando se comparan las cepas mediante el test log-rank (en mayúsculas) o mediante el test de Breslow (minúsculas) con un nivel de significación $<0,050$.

Los aislados *bbcom* y *rf* fueron los más virulentos y no mostraron diferencias significativas entre sí en la supervivencia media de los grupos tratados. La mediana de la supervivencia de los mosquitos tratados con estas cepas estuvo en torno a los 6 días (Tabla 21). Sí que mostraron diferencias respecto de las otras dos cepas de *B. bassiana* (*tom1* y *tom2*) y *M. anisopliae* (*ma*) en el grupo alimentado solo con azúcar, observándose una mortalidad más tardía con una mediana entorno a los 7 y 8 días respectivamente (Figura 49). No fue así en los grupos de hembras alimentadas con sangre donde no se observaron diferencias significativas entre los cuatro tratamientos con la especie *B. bassiana* al final del experimento (Tabla 21). Sin embargo, con el test de comparación de curvas de supervivencia de Breslow sí muestran diferencias significativas entre los aislados *rf* y *bbcom* por un lado, *tom2* y *tom1* por otro lado y, por último, *ma* en los primeros días post-tratamiento. Estos dos últimos presentan diferencias significativas en cuanto al inicio del periodo de toxicidad sobre los mosquitos previamente alimentadas con sangre (Figura 49).

La especie *M. anisopliae* fue significativamente menos activa respecto a las otras cepas utilizadas para los tratamientos debido a que se registró menor porcentaje de mortalidad, así como una mortalidad de mosquitos más tardía (medianas entorno a los 8 días en las hembras alimentadas con azúcar y de 9 días en las que ingirieron sangre) (Tabla 22).

El 82% de los mosquitos del grupo control sobrevivieron más allá de los 15 días que duró el experimento.

Figura 49. Tiempo en días en el que se produce la muerte de los mosquitos tras recibir los tratamientos A. alimentados con azúcar B. alimentados con sangre. Los valores atípicos del grupo control están marcados con asteriscos y con círculos en el resto de tratamientos

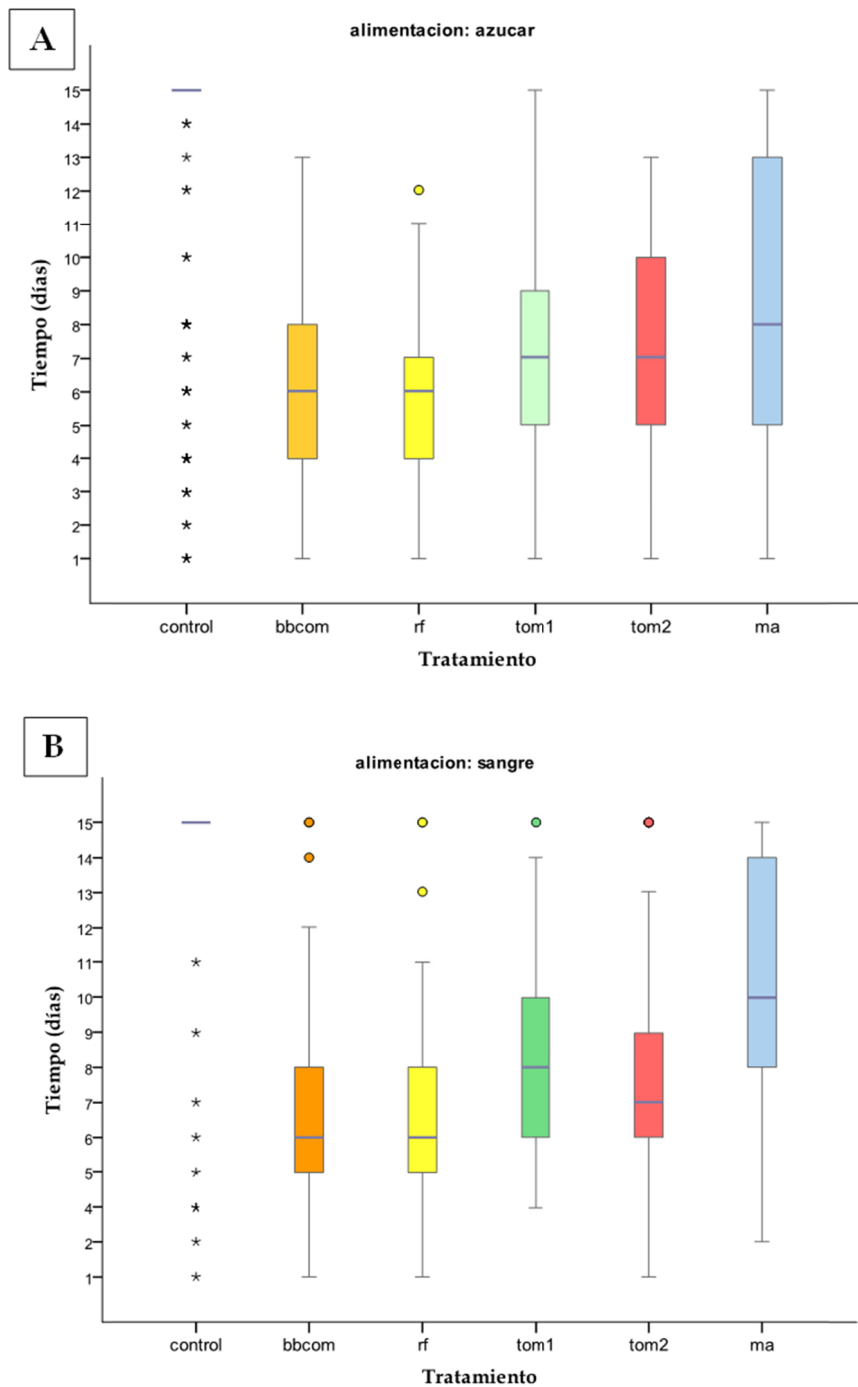


Tabla 22. Medianas de la supervivencia calculada en base diaria a continuación de la exposición de los mosquitos (con distinto régimen alimenticio) a los distintos aislados de *M. anisopliae* y *B. bassiana*. El valor entre paréntesis corresponde con los intervalos de confianza al 95%

		♀ alimentadas con azúcar	♀ alimentadas con sangre
Tratam.		Supervivencia	Supervivencia
<i>B. bassiana</i>	<i>ma</i>	8,000 (6,623-9,377)	9,000 (6,934-11,066)
	<i>tom1</i>	7,000 (5,959-8,041)	8,000 (7,066-8,934)
	<i>tom2</i>	7,000 (6,373-7,627)	7,000 (6,185-7,815)
	<i>bbcom</i>	6,000 (5,028-6,972)	6,000 (5,229-6,771)
	<i>rf</i>	6,000 (5,473-6,527)	6,000 (5,542-6,458)

La virulencia frente a mosquito tigre de las cinco cepas fúngicas se valoró mediante la determinación del tiempo letal 50 y 90. En todas las réplicas realizadas, la longevidad de los mosquitos tratados con conidios fue significativamente menor ($P < 0,001$) que en los grupos control.

Los valores de LT_{50} oscilaron entre 6,60 y 6,81 días ($\pm 95\%$ límites de confianza) en las cepas *rf* y *bbcom* de *B. bassiana*, demostrando ser las más virulentas. El aislado *ma* de *M. anisopliae*, con LT_{50} de 10,12 días ($\pm 95\%$ límites de confianza) resultó ser el hongo menos tóxico para la población de ensayo.

Como se puede ver en la Tabla 23, de forma general, los valores de LT_{50} sobre hembras alimentadas con sangre fueron significativamente superiores al de las alimentadas únicamente con azúcar.

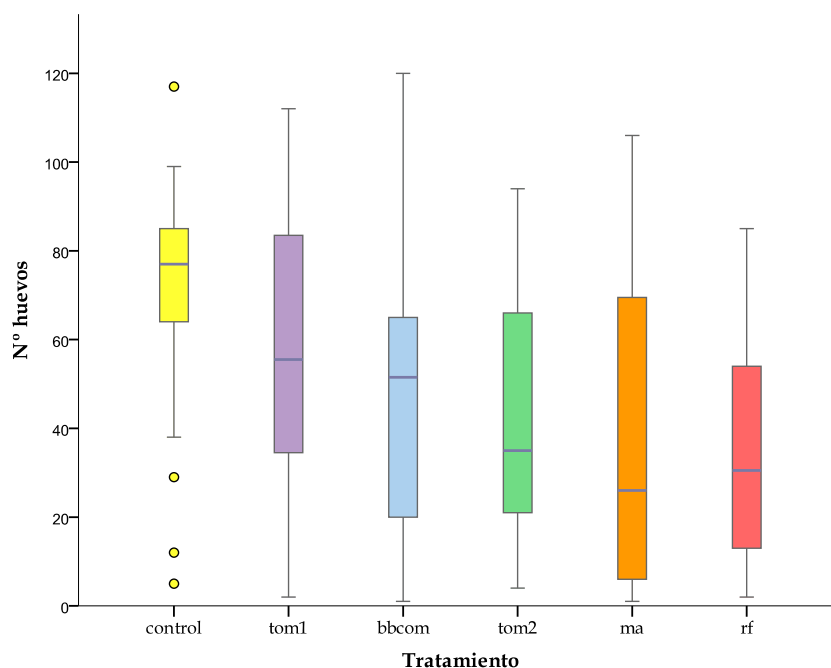
Tabla 23. Tiempo letal 50 y 90 (en días) de los diferentes aislados de hongos testados frente a adultos de *Ae. albopictus* con distinto régimen alimenticio

Tratam	♀ alimentadas con azúcar			♀ alimentadas con sangre		
	LT_{50}	LT_{90}	Slope \pm ES	LT_{50}	LT_{90}	Slope \pm ES
<i>rf</i>	6,81 (4,72-8,63)	7,94 (5,19-9,82)	0,37 \pm 0,022	8,17 (4,65-12,12)	9,55 (5,05-13,80)	0,28 \pm 0,033
<i>bbcom</i>	6,60 (4,43-8,30)	7,79 (4,80-9,63)	0,33 \pm 0,020	8,39 (5,23-11,35)	9,81 (5,63-13,03)	0,28 \pm 0,160
<i>tom2</i>	7,91 (5,44-9,91)	9,19 (5,84-11,34)	0,31 \pm 0,018	9,91 (6,33-13,25)	11,43 (6,73-15,04)	0,26 \pm 0,022
<i>tom1</i>	8,10 (5,65-10,24)	9,77 (6,18-11,80)	0,29 \pm 0,016	9,52 (6,4-12,80)	10,61 (6,83-14,14)	0,37 \pm 0,030
<i>ma</i>	10,12 (6,20-12,90)	14,34 (7,50-17,63)	0,15 \pm 0,009	12,13 (7,71-16,36)	13,87 (8,11-18,43)	0,23 \pm 0,190

III.3.2. Bioensayo 2: Efecto de la infección fúngica sobre la fecundidad y fertilidad de hembras de *Ae. albopictus*

Como se muestra en la Tabla 24, el porcentaje de hembras que ovipositaron fue mayor en el grupo que recibió el tratamiento control, si bien no fue significativo, respecto del resto de grupos de mosquitos tratados con hongos. La prueba de significación de Chi-cuadrado de Pearson no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento en cuanto a la capacidad de las hembras de poner huevos ($X^2=9,802$; $gl=5$; $P=0,081$).

Figura 50. Número de huevos ovipositados tras recibir los distintos tratamientos



Como se aprecia en la Figura 50, de manera general, las hembras sometidas al tratamiento control pusieron más huevos que las que fueron pulverizadas con hongos. Los valores marcados con un círculo amarillo corresponden a aquellos valores atípicos en el grupo control.

Sin embargo, sí se observó que el tipo de tratamiento influyó en el tamaño de puesta de huevos de forma significativa ($KW=20,532$; $gl=5$; $P=0,001$). Con el fin de poder evaluar las diferencias derivadas de los tratamientos sobre la fecundidad (número de huevos puestos por hembra), se realizaron diferentes pruebas de comparación por pares (U de Mann-Whitney o t de student), teniendo en cuenta la normalidad de cada muestra (Tabla 24).

Tabla 24. Resultados de fecundidad de las hembras tras los tratamientos

Tratam	n	ovoposición	Nº de huevos puestos por hembras fecundas							
			media	SD	Sig.	Q1	Mediana	Q3	min	Máx
<i>control</i>	45	66,70%	71,67	25,76	a	62,25	77,00	85,50	5	117
<i>tom1</i>	40	40,00%	58,69	32,28	ab	33,25	55,50	83,75	2	112
<i>bbcom</i>	40	55,00%	53,27	36,23	bc	18,50	51,50	72,25	1	120
<i>tom2</i>	40	40,00%	43,38	28,27	bc	19,50	35,00	67,50	4	94
<i>ma</i>	40	57,50%	41,04	34,71	bc	5,00	26,00	73,00	1	106
<i>rf</i>	40	45,00%	35,39	27,17	cd	12,50	30,50	57,75	2	85

Los valores seguidos de la misma letra indican que los resultados no fueron significativamente diferentes cuando se comparan los aislados mediante la prueba U de Mann-Whitney o t de student según la normalidad de los datos, con un nivel de significación ≤ 0.05 .

Posteriormente, se evaluó si hubo efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de adultos eclosionados a partir de los huevos procedentes de hembras tratadas. Como se puede ver en la Figura 51 y se detalla en la Tabla 25, el porcentaje de eclosión no mostró apenas diferencias entre tratamientos, aunque *rf* y *tom1* si que mostraron diferencias significativas respecto al grupo control demostrando así que de alguna manera, los tratamientos con estos hongos afectan a la fertilidad de *Ae. albopictus* ($KW=33,64$; $g1=5$; $P<0,001$).

Figura 51. Emergencia de adultos (%) a partir de huevos procedentes de hembras tratadas

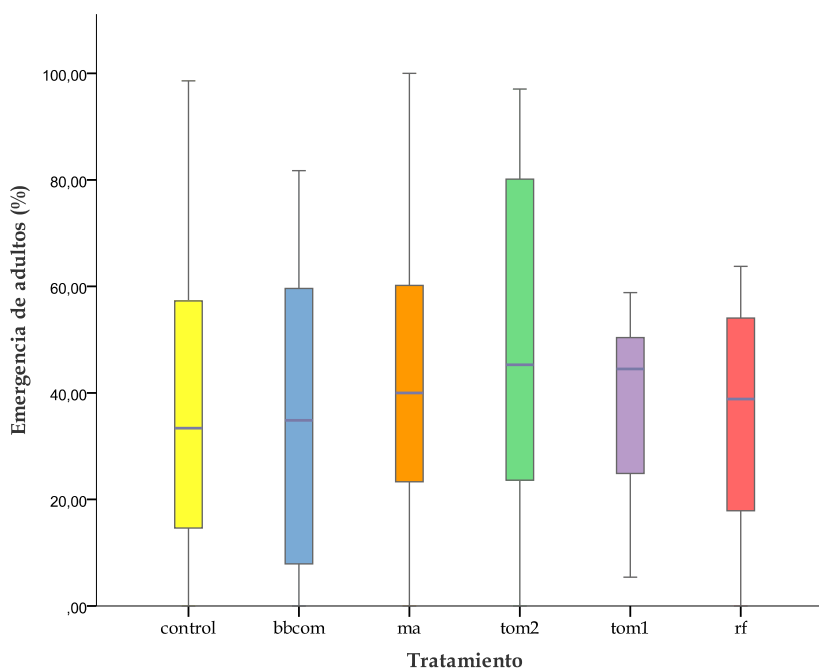


Tabla 25. Porcentaje de eclosión de adultos respecto del n° total de huevos ovipositados por hembras tratadas

Tratam	n	media	SD	Sig.	Q1	Mediana	Q3	min	Máx
<i>control</i>	2150	39,76	23,49	bc	21,42	36,84	57,26	0	98,59
<i>bbcom</i>	1172	42,15	24,82	ab	21,74	36,70	64,16	0	81,73
<i>ma</i>	944	40,99	20,62	ab	21,21	44,33	52,05	0	100
<i>tom2</i>	694	41,21	31,77	abcd	9,63	38,89	67,74	0	97,06
<i>tom1</i>	939	36,42	17,99	d	12,96	43,75	50,77	5,41	58,82
<i>rf</i>	637	36,89	20,90	d	22,22	39,40	54,05	0	73,77

III.4. Discusión

Los hongos entomopatógenos han demostrado su utilidad para el control de plagas, principalmente agrícolas, sin embargo, pocos trabajos han profundizado en el desarrollo de técnicas para la infección de culícidos implicados en la transmisión de enfermedades. El presente trabajo muestra que los cinco aislados de nuestra colección (cuatro de *B. bassiana* y uno de *M. anisopliae*) eran virulentos frente a adultos de *Ae. albopictus*. Se han observado diferencias significativas en la mortalidad total, así como en la supervivencia acumulada de los mosquitos tratados con hongos frente a los controles. Se ha observado diferente virulencia entre distintos aislados (Kryokov y cols., 2010) que se podría relacionar con la diversidad genética (Johny y cols., 2012), la cual se ha atribuido a la consideración de que *B. bassiana* realmente es un complejo de especies (Uma Devi y cols., 2006). Cabe destacar que la cepa de *B. bassiana* más virulenta de nuestro estudio, aislada de *Rhynchophorus ferrugineus* (*rf*), mostró resultados semejantes estadísticamente a la cepa comercial (*bbcom*) de esa misma especie. El 80% de los mosquitos tratados con el aislado de suelo de la especie *M. anisopliae* (*ma*), sucumbieron a la micosis, no obstante, mostraron una supervivencia media superior a los otros aislados. Este hecho contrasta con los publicado en otros estudios como el de Paula y cols. (2008) que describen a *M. anisopliae* como más virulento que *B. bassiana*; y los de Scholte y cols. (2007) y Leles y cols. (2010), que obtienen un LT_{50} inferior al de nuestro estudio.

En nuestros experimentos, pudimos observar una cierta resistencia a la infección por parte de las hembras que habían ingerido sangre previamente, hecho que Paula y cols. (2011) también observaron en ensayos de *M. anisopliae* frente a hembras de *Ae. aegypti*. Anotaron que, durante las primeras 72 horas post- tratamiento, las hembras alimentadas con sangre son menos susceptibles a la infección por HE. Pasadas 96 horas (coincidiendo con la digestión de la sangre), la susceptibilidad a la infección vuelve a aumentar alcanzando niveles similares a los insectos alimentados con azúcar. Este hallazgo podría deberse a una mayor estimulación del sistema inmune en las hembras alimentadas con sangre. En estudios hechos con *Anopheles stephensi* Liston, 1901, se ha descrito que la sangre en combinación con el azúcar incrementa la cascada de melanización, por lo que los insectos alimentados sólo con azúcar son menos inmunocompetentes (Koella y Sorensen, 2002).

En los procesos de selección de aislados destinados a proyectos de control biológico de aedinos, el periodo de actividad de los HE puede tener consecuencias en la transmisión de enfermedades como el dengue, chikunguña o zika cuyo periodos de incubación extrínseca oscilan alrededor de los 7 días. Así, una cepa que tarde mucho en matar al mosquito y por lo tanto permita que se vuelva a picar, no será interesante desde el punto de vista epidemiológico puesto que el interés radica en impedir la transmisión. En concreto, se han descrito efectos sobre los hábitos de alimentación, los mosquitos tienden a picar menos y/o ingerir menor cantidad de sangre y néctar con consecuencias sobre la fecundidad (Scholte y cols., 2006; Mnyone y cols., 2011; Blanford y cols., 2012; Darbro y cols., 2012; Ondiaka y cols., 2015). Uno de los aspectos más

importantes y por lo que los HE suscitaron interés fue por su capacidad para interferir entre patógeno y vector. Scholte y cols. (2003, 2005, 2008) probaron la actividad adulticida de *M. anisopliae* frente a vectores de malaria así como el potencial de reducir la transmisión de los esporozoitos responsables de producir la enfermedad. Por otro lado, más recientemente, otros autores (Dong y cols., 2012; Garza-Hernández y cols., 2013) demostraron que las infecciones por *B. bassiana* y *M. anisopliae* reducían la capacidad de *Ae. aegypti* para transmitir el dengue.

Así, en el caso de artrópodos vectores de enfermedades, la muerte rápida del insecto puede no ser lo más conveniente, como puede ocurrir en el caso de otras plagas agrícolas. Si el insecto antes de morir llega a ovipositar o a copular, puede incluso llegar a autodiseminar las esporas por los focos de cría (infectando así a las larvas o incluso a otras hembras que se acerquen a ovipositar) o transmitirlos a través de la cópula como algunos autores han descrito que ocurre con *Ae. aegypti* (Garza-Hernández y cols., 2015), afectando así directamente a la fecundidad y la duración del ciclo gonotrófico de las hembras (Garza-Hernández y cols., 2013). Nuestro estudio aporta evidencias de que la infección fúngica afecta negativamente a la fertilidad de las hembras. El aislado de *B. bassiana* (*rf*) indujo en las hembras una puesta de huevos menor, así como una descendencia viable inferior. Darbro y cols. (2012) observaron que las hembras de *Ae. aegypti* infectadas con *B. bassiana* reducían un 30% los intentos de picada y además ovipositaban menor cantidad de huevos. Los mismos autores también observaron que la hembras ponían huevos antes y en mayor cantidad que los controles, pero al final del experimento la fecundidad de los controles era mayor, probablemente porque éstos presentan mayor supervivencia y tienen más tiempo para madurar los huevos y realizar la puesta. En nuestro estudio, observamos que la mayoría de hembras infectadas retenían los huevos y ovipositaban poco antes de morir, probablemente debido a la pérdida de energía y reservas nutricionales derivadas de la micosis. García-Munguía y cols. (2011) también registraron una reducción del 69-95% en la fecundidad de las hembras de *Ae. aegypti* tratadas con diferentes cepas de *B. bassiana*. Por otro lado, a pesar de que no hemos encontrado evidencias del efecto nocivo de la infección por *M. anisopliae* sobre la fecundidad de *Ae. albopictus*, Garza-Hernández y cols. (2013) sí que describieron una reducción de la fecundidad así como en la duración del ciclo gonotrófico de *Ae. aegypti*.

A pesar de que los HE han sido muy estudiados como método de control de mosquitos vectores de enfermedades como es la especie *An. gambiae* en el control del paludismo y *Ae. aegypti*, principal vector del dengue, no se dispone de muchos estudios sobre el efecto de estos tratamientos frente a *Aedes albopictus*. Comparar la susceptibilidad a distintas cepas de HE de diferentes especies de mosquitos resulta complejo porque se incorporan a menudo diferencias en las condiciones experimentales. Teniendo en cuenta nuestros resultados, sería conveniente seguir trabajando en las dos cepas *bbcom* y *rf* como potenciales candidatos para el control de adultos de mosquito tigre. Sería interesante trabajar con la susceptibilidad de poblaciones de *Ae. albopictus* naturales, debido a que, como hemos comentado en el capítulo anterior, existe una gran variabilidad genética en las poblaciones de mosquito

tigre en campo que podría alterar su capacidad para combatir la infección por HE. Además, se ha descrito que el insecto hospedador puede ejercer una presión de selección que favorezca a algunos genotipos del hongo; es decir, hay una selección natural de estos microorganismos en términos de especialización con respecto al hospedador (Maurer y cols., 1997) lo que podría también explicar las diferencias de virulencia encontradas en nuestros aislados. Carolino y cols. (2014), observaron una pérdida de virulencia de los conidios expuestos a condiciones naturales pasados 12 días.

Sin duda, uno de los mayores retos en este campo de los micoinsecticidas es el trabajo en la mejora de las técnicas de aplicación, optimización de las diluciones de conidios así como la persistencia de la virulencia del hongo en campo, con el fin de hacer de los hongos entomopatógenos una herramienta rentable y eficiente para el control de mosquitos (Thomas, 2018).

CONCLUSIONES GENERALES

1. La vigilancia entomológica de *Aedes albopictus* durante los últimos años, ha constatado un drástico aumento de su área de distribución así como una aceleración del proceso de dispersión. Se ha comprobado que se encuentra presente, establecido y en pleno proceso de dispersión por Baleares, Comunidad Valenciana, Murcia, Andalucía y Aragón. Las poblaciones detectadas en País Vasco estaban estabilizadas y no se detectó difusión a nivel local.

2. Mediante el estudio de la actividad reproductora de *Ae. albopictus*, durante los años 2015 y 2016, se ha podido determinar que el mosquito tigre está activo al menos nueve meses al año. Los primeros signos de actividad aparecen en el mes de marzo en Alicante y Castellón, sugiriendo una salida temprana de diapausa en el mes de febrero. Sin embargo, en el resto de localidades estudiadas en Murcia y Málaga, la reanudación biológica con mayor intensidad tiene lugar en los meses de abril y mayo. Se han detectado varios picos de máxima densidad de huevos entre los meses de julio, agosto y septiembre, siendo este último el más notable. A partir de ese momento, se produce una reducción importante de la abundancia, a finales de octubre y, se registra el fin de la actividad de mosquito tigre entorno a los meses de noviembre/diciembre.

3. El estudio de la estructura genética de las poblaciones de *Ae. albopictus* detectadas en España, combinando los análisis de los marcadores genéticos COI e ITS2, ha permitido detectar la presencia de haplotipos comunes con otros países del mundo lo que sugiere múltiples eventos de introducción desde diferentes orígenes, facilitados por diversos medios antrópicos.

4. La gran diversidad genética obtenida sugiere que, en España, la dispersión de *Ae. albopictus* ha tenido lugar mediante la combinación de varios procesos de expansión. Por un lado, la difusión a escala local y, por otro, la expansión brusca y a escala nacional, que sugiere un transporte pasivo de ejemplares en vehículos de distinta índole.

5. Todos los mosquitos que murieron en el estudio tras ser tratados con los aislados de hongo mostraron signos de crecimiento fúngico sobre los cadáveres. La muerte, por tanto, se debe a la micosis inducida, soportando la posible utilidad de los hongos entomopatógenos como método de control biológico de *Ae. albopictus*.

6. Las cepas tom1 y tom2 de *B. bassiana*, con niveles de virulencia significativamente similares, mostraron un TL50 en torno a los 8 días, lo que supuso una mayor actividad que la de la cepa de *M. anisopliae*, siendo ésta la menos virulenta de las estudiadas, con un TL50 de alrededor de 10 días. Las cepas más virulentas fueron rf y bbcom, con TL50 cercanos a los 6 días, periodo que se ajustaría con el tiempo requerido para interferir en la posible transmisión de arbovirus, por lo que se convertirían en candidatos aptos para ensayos futuros.

7. Todas las cepas de hongos entomopatógenos empleadas en los tratamientos mostraron efectos significativamente negativos sobre la fecundidad de las hembras de *Ae. albopictus*, pero no sobre su fertilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Franch, F., Zamora-Perea, E. y Luz, S.L.B. (2017). Mosquito-Disseminated Insecticide for Citywide Vector Control and Its Potential to Block Arbovirus Epidemics: Entomological Observations and Modeling Results from Amazonian Brazil. *PLOS Medicine*; 14(1): e1002213.
- Abramides, G.C., Roiz, D., Guitart, R., y cols. (2011). Effectiveness of a multiple intervention strategy for the control of the tiger mosquito (*Aedes albopictus*) in Spain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 105: 281-288.
- Abramides, G.C., Roiz, D., Guitart, R., y cols. (2013). Control of the asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) in a firmly established area in Spain: Risk factors and people's involvement. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 107: 706-714.
- Achee, N.L., Gould, F., Perkins, T.A. y cols. (2015). A critical assessment of vector control for dengue prevention. *PLOS Neglected Tropical Diseases*; 9(5): e0003655.
- Adelman, Z.N. y Tu, Z. (2016). Control of mosquito-borne infectious diseases: sex and gene drive. *Trends in Parasitology*; 32(3):219-229.
- Adhami, J. y Murati, N. (1987). The presence of the mosquito *Aedes albopictus* in Albania. *Revista Mjekësore*; 1: 13-16.
- Adhami, J. y Reiter, P. (1998). Introduction and establishment of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* Skuse (Diptera: culicidae) in Albania. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 14(3): 340-343.
- Agencia europea de los productos químicos (ECHA). (<http://echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals/biocidal-active-substances>)
- Aguirre-Obando, O.A. y Navarro-Silva, M.A. (2017). How much is known about the genetic diversity of the Asian tiger mosquito? A systematic review. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*; 49: 422-437.
- Aguirre-Obando, O.A., Martins, A.J. y Navarro-Silva, M.A. (2017). First report of the Phe1534Cys kdr mutation in natural populations of *Aedes albopictus* from Brazil. *Parasites & Vectors*; 10(1): 160.
- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A. y cols. (2007). Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 57: 1117-1125.
- Akey, D.H. y Jones, J.C. (1968). Sexual responses of adult male *Aedes aegypti* using the forced-copulation technique. *The Biological Bulletin*; 135 (3):445-453.
- Akiner, M.M., Demirci, B., Babuadze, G. y cols. (2016). Spread of the invasive mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Black Sea region increases risk of Chikungunya, Dengue, and Zika outbreaks in Europe. *PLOS Neglected Tropical Diseases*; 10(4): e0004664.
- Alarcón-Elbal, P., Delacour, S., Pinal, R., y cols. (2010). Establecimiento y mantenimiento de una colonia autóctona española de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* Skuse, 1894, (Diptera, Culicidae) en laboratorio. *Revista Ibero-latinoamericana de parasitología*; 69: 140-148.
- Alean-Carreño, I. (2003). Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis*

Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Trabajo de grado para optar al título de Microbióloga Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de ciencias básicas de Bogotá, D.C. Colombia.

- Allen, J.C. (1976). A modified sine wave method for calculating day degrees. *Environmental Entomology*; 5: 388-396.
- Alphey, L., Benedict, M., Bellini, R. y cols. (2010). Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector Borne Zoonotic Diseases*; 10:295-311.
- Alto, B.W. y Juliano, S.A. (2001). Temperature effects on the dynamics of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations in the laboratory. *Journal of Medical Entomology*; 38: 548-556.
- Alves, S.B. (1986). Controle microbiano de insectos. São Paulo, Editor: Manole.
- American Mosquito Control Association. (AMCA). (2017). Best practices for integrated mosquito management: a focused update.
- Anderson, J.F., Ferrandino, F.J., Dingman, D.W. y cols. (2011). Control of mosquitoes in catch basins in Connecticut with *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Bacillus sphaericus* and spinosad. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 27:45-55.
- Angolotti, E. (1980). La fiebre amarilla. Historia y situación. actual. La fiebre amarilla en la Barcelona de 1821. *Revista de sanidad e higiene pública*; 54:89-102.
- Aranda, C., Eritja, R. y Roiz, D. (2006). First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Medical and Veterinary Entomology*; 20: 150-152.
- Armbruster, P.A. (2016). Photoperiodic diapause and the establishment of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in North America. *Journal of Medical Entomology*; 53(5): 1013-1023.
- Armstrong, P.M., Andreadis, T.G., Shepard, J.J. y cols. (2017). Northern range expansion of the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*): Analysis of mosquito data from Connecticut, USA. *PLOS Neglected Tropical Diseases*; 11(5): 1-13.
- Atyame, C.M., Labbé, P., Lebon, C. y cols. (2016). Comparison of irradiation and *Wolbachia* based approaches for sterile-male strategies targeting *Aedes albopictus*. *PLoS One*; 11(1): 1-15.
- Baldacchino, F., Caputo, B., Chandre, F. y cols. (2015). Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: A review. *Pest Management. Science*; 71: 1471-1485.
- Balestrino, F., Puggioli, A., Carrieri, M. y cols. (2017). Quality control methods for *Aedes albopictus* sterile male production. *PLOS Neglected Tropical Diseases*; 11(9): e0005881.
- Banco mundial (2016). Disponible el 27/03/2018 en URL: <http://www.bancomundial.org/es/publication/reference>
- Bandelt, H.J., Forster, P. y Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*; 16: 37-48.
- Barceló, C., Bengoa, M., Monerris, M. y cols. (2015). First record of *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera; Culicidae) from Ibiza (Balearic Islands; Spain). *Journal of the European Mosquito Control Association*; 33: 1-4.
- Barrera, R., Mackay, A.J., Amador, M.A. y cols. (2010). Field trials of a new gravid-ovitrap for integrated area-wide control of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 83:179.

- Battaglia, V., Gabrieli, P., Brandini, S. y cols. (2016). The Worldwide Spread of the Tiger Mosquito as Revealed by Mitogenome Haplogroup Diversity. *Frontiers in Genetics*; 7: 208.
- Beaty, B.J. y Marquardt, W.C. (1996). Natural cycles of vector-borne pathogens. En: The biology of disease vectors. University Press of Colorado, Niwot, Colorado, 51-71.
- Becker, N., Geier, M., Balczun, C. y cols. (2013). Repeated introduction of *Aedes albopictus* into Germany, July to October 2012. *Parasitology Research*; 112: 1787-1790.
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M. y cols. (2003). Mosquitoes and their control, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 498 pp.
- Beebe, N.W., Ambrose, L., Hill, L.A. y cols. (2013). Tracing the Tiger : Population genetics provides valuable insights into the *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* invasion of the Australasian Region. *PLOS Neglected Tropical Diseases*; 7.
- Berntsen, B.T., James, A.A. y Christensen, B.M. (2000). Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 64:115-137.
- Bellini, R., Albieri, A., Carrieri, M. y cols. (2009). Efficacy and lasting activity of four IGRs formulations against mosquitoes in catch basins of northern Italy. *European Mosquito Bulletin*; 27: 33-46.
- Bellini, R., Calvitti, M., Medici, A. y cols. (2007). Use of the sterile insect technique against *Aedes albopictus* in Italy: First results of a pilot trial. En: M.J.B. Vreysen, A.S. Robinson, y J. Hendrichs (Eds.), Area-Wide Control of Insect Pests: 505-515.
- Bellini, R., Zeller, H. y Van Bortel, W. (2014). A review of the vector management methods to prevent and control outbreaks of West Nile virus infection and the challenge for Europe. *Parasites & Vectors*; 7: 323.
- Benallal, K.E., Allal-Ikhlef, A., Benhamouda, K. y cols. (2016). First report of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Oran, West of Algeria. *Acta Tropica*; 164: 411-413.
- Benedict, M.Q., Levine, R.S., Hawley, W.A. y cols. (2007). Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoonotic Diseases*; 7(1): 76-85.
- Benelli, G. (2015). Plant-borne ovicides in the fight against mosquito vectors of medical and veterinary importance: a systematic review. *Parasitology Research*; 114: 3201-3212.
- Benelli, G., Jeffries, C.L. y Walker, T. (2016). Biological Control of Mosquito Vectors : Past, Present and Future. *Insects*; 7(4):52.
- Bengoa, M., Eritja, R. y Lucientes, J. (2014). Ground ultra-low volume adulticiding field trials using pyrethroids against *Ae. albopictus* in the Baix Llobregat region, Spain. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 30(1):42-50.
- Bengoa, M., Eritja, R., Delacour, S., y cols. (2017). First Data on Resistance to Pyrethroids in Wild Populations of *Aedes albopictus* from Spain. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 33: 246-249.
- Bennouna, A., Balenghien, T., El Rhaffouli, H. y cols. (2017). First record of *Stegomyia albopicta* (= *Aedes albopictus*) in Morocco: a major threat to public health in North Africa? *Medical and Veterinary Entomology*; 31: 102-106.

- Bilal, H., Hassan, S.A. y Khan, I.A. (2012). Isolation and efficacy of entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*) for the control of *Ae. albopictus* Skuse larvae: suspected dengue vector in Pakistan. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*; 2:298–300.
- Birungi, J. y Munstermann, L.E. (2002). Genetic structure of *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: Evidence for an independent invasion into Brazil and United States. *Annals of the Entomological Society of America*; 95: 125-132.
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A. y Humber, R.A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium Anisopliae* Lineage." *Mycologia*; 101 (4): 512–530.
- Black, W.C., Ferrari, J.A. y Sprengert, D. (1988a). Breeding structure of a colonising species: *Aedes albopictus* (Skuse) in the United States. *Heredity* (Edinb); 60: 173–181.
- Black, W.C., Hawley, W.A., Rai, K.S. y cols. (1988b). Breeding structure of a colonizing species: *Aedes albopictus* (Skuse) in peninsular Malaysia and Borneo. *Heredity* (Edinb); 61: 439–446.
- Blair, C.D. y Olson, K.E. (2015). The role of RNA interference (RNAi) in arboviruses–vector interactions. *Viruses*; 7:820–843.
- Blandford, S., Chan, B.H.K., Jenkins, N., y cols. (2005). Fungal pathogen reduces potential for Malaria transmission. *Science*, 308: 1638-1641.
- Blanford, S. (2012). Storage and persistence of a candidate fungal biopesticide for use against adult malaria vectors. *Malaria Journal*; 11:1–14.
- Bonacci, T., Mazzei, A., Hristova, V. y cols. (2015). Monitoring of *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in Calabria, Southern Italy. *International Journal of Scientific & Engineering Research*; 6(5).
- Bonacci, T., Mazzei, A., Karapetkovska-Hristova, V y cols. (2015). Monitoring of *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in Calabria, Southern Italy. *International Journal of Scientific and Engineering Research*; 6(5):290-293.
- Bonds, J.A.S. (2012). Ultra-low-volume space sprays in mosquito control: a critical review. *Medical and Veterinary Entomology*; 26:121–130.
- Bonizzoni, M., Gasperi, G., Chen, X. y cols. (2013). The invasive mosquito species *Ae. albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends Parasitology*; 29: 460–468.
- Boomsma, J.J., Jensen, A.B., Meyling, N.V. y cols. (2014). Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. *Annual Review of Entomology*; 59:467–485.
- Boubidi, S.C., Roiz, D., Rossignol, M. y cols. (2016). Efficacy of ULV and thermal aerosols of deltamethrin for control of *Ae. albopictus* in nice, France. *Parasites & Vectors*; 9(1):597.
- Bouyer, J. y Lefrançois, T. (2014). Boosting the sterile insect technique to controlmosquitoes. *Trends Parasitology*; 30:271–273.
- Bouyer, J., Chandre, F., Gilles, J. y cols. (2016). Alternative vector control methods to manage the Zika virus outbreak: More haste, less speed. *Lancet Global. Health*; 4.
- Bowman, L.R., Donegan, S. y McCall, P.J. (2016). Is Dengue Vector Control Deficient inEffectiveness or Evidence?: Systematic Review and Meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*; 10(3):e0004551.

- Boyce, R., Lenhart, A., Kroeger, A. y cols. (2013). *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. *Tropical Medicine & International Health*; 18:564-577.
- Boyer, S., Foray, C. y Dehecq, J.S. (2014). Spatial and temporal heterogeneities of *Aedes albopictus* density in La Reunion Island: rise and weakness of entomological indices. *PLoS ONE*; 9(3): e91170.
- Bradshaw, W.E. y Holzapfel, C.M. (2008). Genetic response to rapid climate change: it's seasonal timing that matters. *Molecular Ecology*; 17(1): 157-66.
- Brady, O.J., Johansson, M.A., Guerra, C.A. y cols. (2013). Modelling adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* survival at different temperatures in laboratory and field settings. *Parasites & Vectors*; 6: 351-362.
- Broche, R.G. y Borja, E.M. (1999). *Aedes albopictus* in Cuba. *Journal of American Mosquito Control Association*; 15(4): 569-70.
- Brower, A.V.Z. (1994). Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 91:6491-6495.
- Brown, D.M., Alphey, L.S., McKemey, A. y cols. (2014). Criteria for identifying and evaluating candidate sites for open-field trials of genetically engineered mosquitoes. *Vector Borne Zoonotic Diseases*; 14:291-299.
- Buckner, E.A., Williams, K.F., Marsicano, A.L. y cols. (2017). Evaluating the vector control potential of the In2Care® mosquito trap against *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* under semifield conditions in manatee county, florida. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 33(3): 193-199.
- Bueno Marí, R., Bernués Bañeres, A., Muñoz Rodríguez, M. y cols. (2013). Primera cita de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) en la provincia de Valencia (Diptera, Culicidae). *Boletín de la Asociación española de Entomología*; 37: 375-378.
- Bueno Marí, R. y García-Mujica, P. (2015) Establecimiento de una nueva especie invasora para la provincia de Almería: el mosquito tigre, *Aedes albopictus* (Skuse, 1894). *Sociedad Gaditana de Historia Natural*; 9: 31-33.
- Bueno Marí, R., Acosta Aleixandre, R. y Serna Mompeán, J.P. (2014) Primeras capturas de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) en el Área Metropolitana de Valencia. *Archivos Entomológicos*; 12:103-108.
- Bueno Marí, R., García Mújica, P., Rico Miralles, J. y cols. (2012). Nuevos datos sobre el proceso de expansión de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera, Culicidae) por el sureste de la Península Ibérica: hallazgo de la especie en Mazarrón (Murcia, España). *Boletín de la Asociación española de Entomología*; 51: 307-309.
- Bueno-Marí, R. y Jiménez Peydró, R. (2012). Health implications of the establishment and spread of *Aedes albopictus* in Spain. *Revista Española de Salud Pública*; 86: 319-330.
- Bueno-Marí, R. y Jiménez-Peydró, R. (2010) ¿Pueden la malaria y el dengue reaparecer en España? *Gaceta Sanitaria*; 24: 347-353.
- Bueno-Marí, R., Lluch Escribano, J.A. y Gambín Molina, B. (2014). Primer registro de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) en la mancomunidad de l'Alacantí. Acciones para evitar su dispersión. *Cuadernos de biodiversidad*; 44: 12-16.

- Calbá, C., Guerbois-Galla, M., Franke, F. y cols. (2017). Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France, July to September 2017. *Eurosurveillance*; 22: 17-00647.
- Caminade, C., Medlock, J.M., Ducheyne, E. y cols. (2012). Suitability of European climate for the Asian Tiger mosquito *Aedes albopictus*: recent trends and future scenarios. *Journal of the Royal Society Interface*; 9: 2708-2717.
- Canali, M., Rivas-Morales, S., Beutels, P. y cols. (2017). The cost of arbovirus disease prevention in Europe: Area-wide integrated control of tiger mosquito, *Aedes albopictus*, in Emilia-Romagna, Northern Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*; 14.
- Cancrini, G., Romi, R., Gabrielli, S. y cols. (2003). First finding of *Dirofilaria repens* in a natural population of *Ae. albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*; 17(4): 448-451.
- Cañedo, V. y Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el manejo de Hongos entomopatógenos.
- Caputo, B., Ienco, A., Cianci, D. y cols. (2012). The 'auto-dissemination' approach: a novel concept to fight *Aedes albopictus* in urban areas. *PLOS Neglected Tropical Diseases*; 6:e1793.
- Caputo, B., Ienco, A., Manica, M. y cols. (2015). New adhesive traps to monitor urban mosquitoes with a case study to assess efficacy of insecticide control strategies in temperate areas. *Parasites & Vectors*; 8:134.
- Cargo Router. Route alternatives for shipping cargo from Bambous Virieux, Mauritius to Cesena, Italy. Disponible el 27/03/2018 en: <http://www.cargorouter.com/freight-shipping/Mauritius/Bambous-Virieux/Italy/Cesena/>
- Carlton, J.T. 1996b. Patterns, process and prediction in marine invasion ecology. *Biological Conservation*. 78:97-106.
- Carolino, A.T. (2012). Formulação em óleo aumenta a persistência do fungo entomopatógeno para uso no control do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Tesis Doctoral Universidade estadual do norte fluminense-darcy Ribeiro Campos dos Goytacazes.
- Carolino, A.T., Paula, A.R., Silva, C.P. y cols. (2014). Monitoring persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under simulated field conditions with the aim of controlling adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*; 7: 198.
- Carrieri, M., Angelini, P., Venturelli, C. y cols. (2011). *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Population size survey in the 2007 chikungunya outbreak area in Italy. I. Characterization of breeding sites and evaluation of sampling methodologies. *Journal of Medical Entomology*; 48(6): 1214-1225.
- Carvalho, D.O., McKemey, A.R., Garziera, L. y cols. (2015). Suppression of a Field Population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 9(7): e0003864.
- Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES). (2016). Evaluación Rápida del Riesgo de transmisión de enfermedad por el virus Zika en España. Justificación de la Evaluación de Riesgo: 1-14.

- Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES). (2017). Evaluación rápida del riesgo de chikungunya en España: 1-12.
- Chandler, D. (2017). Basic and applied research on entomopathogenic fungi. En: *Microbial Control of Insect and Mite Pests: 69-89. From Theory to Practice*. Author(s): Lawrence A. Lacey. Elsevier.
- Chandra, G., Bhattacharjee, I., Chatterjee, S.N. y cols. (2008). Mosquito control by larvivorous fish. *Indian Journal of Medical Research*; 127: 13-27.
- Chen, X. (2016). Genome sequence of the Asian Tiger mosquito, *Ae. albopictus*, reveals insights into its biology, genetics, and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 113: E489.
- Chouin-Carneiro, T., Vega-Rua, A., Vazeille, M. y cols. (2016). Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* from the Americas to Zika virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 10(3):1-11.
- Clements, A.N. (1963). The Physiology of Mosquitoes. *Science* 143, Issue 3613: 1430
- Clements, A.N. (1992). *Biology of Mosquitoes: Development Nutrition and Reproduction*; Publisher: Springer Netherlands.
- Coffinet, T., Mourou, J.R., Pradines, B. y cols. (2007). First record of *Ae. albopictus* in Gabon. *Journal of the American Control Association*; 23(4):471-472.
- Colautti, R.I. y MacIsaac, H.J.A. (2004). Neutral terminology to define «invasive» species. *Diversity and Distributions*; 10. 135-141.
- Collantes, F. y Delgado, J.A. (2011). Primera cita de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) en la Región de Murcia. *Anales de Biología*; 33:99-101.
- Collantes, F., Delacour, S., Delgado, J.A. y cols. (2016). Updating the known distribution of *Ae. albopictus* (Skuse, 1894) in Spain 2015. *Acta Tropica*; 164:64-68.
- Collantes, F., Delgado, J.A., Alarcón-Elbal, P.M. y cols. (2014). First confirmed outdoor winter reproductive activity of Asian tiger mosquito (*Ae. albopictus*) in Europe. *Anales de Biología*; 36: 71-76.
- Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). Disponible en: <https://talk.ictvonline.org/>
- Complejo de La Moncloa. Disponible el 5/5/2018 en: <http://www.lamoncloa.gob.es/espana/paishistoriaycultura/geografia/Paginas/index.aspx>
- Cornel, A.J. y Hunt, R.H. (1991). *Aedes albopictus* in Africa? First records of live specimens in imported tires in Cape Town. *Journal of the American Control Association*; 7(1): 107-108.
- Costa- Osório, H., Zé-Zé, L., Neto, M. y cols. (2018). Detection of the invasive mosquito species *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Portugal. *International Journal of Environmental Research and Public Health*; 15: 820.
- Costanzo, K.S., Schelble, S., Jerz, K. y cols. (2015). The effect of photoperiod on life history and blood-feeding activity in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology*; 40: 164-171.

- Costero-Saint Denis, A., Leitner, W.W., Wali, T. y cols. (2016). Meeting Report: Translational considerations of novel vector management approaches. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 10(8).
- Cotteaux-Lautard, C., Berenger, J.M., Fusca, F. y cols. (2013). A new challenge for hospitals in southeast France: monitoring local populations of *Aedes albopictus* to prevent nosocomial transmission of dengue or chikungunya. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 29(1): 81-83.
- Craven, R.B., Eliason, D.A., Francy, D.B. y cols. (1988). Importation of *Aedes albopictus* and other exotic mosquito species into the United States in used tires from Asia. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 4: 138-142.
- Crepeau, T.N., Unlu, I., Healy, S.P. y cols. (2013). Experiences with the large-scale operation of the Biogents Sentinel trap. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 29(2): 177-180.
- Cristescu, M.E. (2015). Genetic reconstructions of invasion history. *Molecular Ecology*; 24: 2212-2225.
- Cunze, S., Kochmann, J., Koch, L.K. y cols. (2016). *Aedes albopictus* and its environmental limits in Europe. *PLOS ONE*; 11(9): e0162116.
- Cupp, E.W., Lok, J.B. y Bowers, W.S. (1977). The developmental effects of 6, 7-dimethoxy-2, 2-dimethyl chromene on the pre-imaginal stages of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata*; 22(1): 23-28.
- Curcó, N. (2007). Mosquito tigre: repercusiones de su llegada a España. *Piel*; 22(5): 238-242.
- Curcó, N., Giménez, N., Serra, M. y cols. (2008). Picaduras por mosquito tigre. Percepción de la población afectada tras el establecimiento de *Ae. albopictus* en España. *Actas Dermo-Sifiliográficas*; 99(9): 708-713.
- Dalla Pozza, G. y Majori, G. (1992). First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 8: 318-320.
- Darbro, J.M. y Thomas, M.B. (2009). Spore persistence and likelihood of aeroallergenicity of entomopathogenic fungi used for mosquito control. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 80:992-997.
- Darbro, J.M., Johnson, P.H., Thomas, M.B. y cols. (2012). Effects of *Beauveria bassiana* on survival, blood-feeding success, and fecundity of *Aedes aegypti* in laboratory and semi-field conditions. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 86: 656-664.
- Das, M.K. y Prasad, R.N. (1991). Evaluation of mosquito fish *Gambusia affinis* in the control of mosquito breeding in rice fields. *Indian Journal of Malariology*; 28: 171-177.
- Day, M.F. (1955). A New sense organ in the head of the mosquito and other nematoceros flies. *Australian Journal of Zoology*; 3(3): 331.
- de Albuquerque, A.L., Magalhães, T., Ayres, C.F.J. (2011). High prevalence and lack of diversity of *Wolbachia pipientis* in *Ae. albopictus* populations from Northeast Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 106: 773-776.
- De Jesus, C.E. y Reiskind, M.H. (2016). The importance of male body size on sperm uptake and usage, and female fecundity in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Parasites & Vectors*; 9: 447.

- Delacour, S., Alarcón-Elbal, P., Bengoa, M. y cols. (2009). *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) primera cita en Torrevieja (Alicante). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*; 45: 518.
- Delacour, S., Barandika, J.F., García-Pérez, A.L. y cols. (2015). Detección temprana de mosquito tigre, *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), en el País vasco (España). *Anales de Biología*; 37: 25-30.
- Delacour-Estrella, S., Bravo-Minguet, D., Alarcón-Elbal, P.M. y cols. (2010). Detección de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) en Benicàssim. Primera cita para la provincia de Castellón (España). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*; 47: 440.
- Delacour-Estrella, S., Collantes, F., Ruiz-Arrondo, I. y cols. (2014). Primera cita de mosquito tigre, *Ae. albopictus* (Diptera, Culicidae), para Andalucía y primera corroboración de los datos de la aplicación Tigatrapp. *Anales de Biología*; 36: 93-96.
- Delacour-Estrella, S., Ruiz-Arrondo, I., Alarcón-Elbal, P.M. y cols. (2016). Primera cita del mosquito invasor *Ae. albopictus* (Diptera, Culicidae) en Aragón: confirmación de su presencia en Huesca capital. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*; 58: 157-158.
- Delatte, H., Gimonneau, G., Triboire, A. y cols. (2009). Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity and gonotrophic cycles of *Ae. albopictus* (Skuse), vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean. *Journal of medical entomology*; 46: 33-41.
- Delatte, H., Bagny, L., Brengue, C. y cols. (2011). Genetics and evolution the invaders: Phylogeography of dengue and chikungunya viruses *Aedes* vectors, on the South West islands of the Indian Ocean. *Infection, Genetics and Evolution Journal. Elsevier*; 11: 1769-1781.
- Delatte, H., Desvars, A., Bouetard, A. y cols. (2010). Blood-feeding behavior of *Ae. albopictus*, vector of chikungunya on La Reunion. *Vector Borne and zoonotic diseases*; 10: 249-258.
- Delatte, H., Toty, C., Boyer, S. y cols. (2013). Evidence of habitat structuring *Ae. albopictus* populations in Reunion Island. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 7(3).
- Delisle, E., Rousseau, C., Broche, B. y cols. (2015). Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Eurosurveillance*; 20(17): 21108.
- Denlinger, D. L. y Armbruster, P. A. (2014). Mosquito Diapause. *Annual Review of Entomology*; 59: 73-93.
- Denlinger, D. L. y Armbruster, P. A. (2016). Molecular physiology of mosquito diapause. 329-361. En: *Advances in Insect Physiology*; 51. Publisher: Elsevier.
- Derraik, J.G.B. (2004). Exotic mosquitoes in New Zealand: a review of species intercepted, their pathways and ports of entry. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*; 28 (5): 433-444.
- Devine, G.J., Perea, E.Z., Killeen, G.F. y cols. (2009). Using adult mosquitoes to transfer insecticides to *Aedes aegypti* larval habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*; 106(28): 11530-11534.
- Dhadialla, T.S., Retnakaran, A. y Smagghe, G. (2009). Insect growth and development disrupting insecticides. 679-739. En: *Insect Development: Morphogenesis, molting and metamorphosis*. ED: Gilbert, Academic Press.

- Di Luca, M., Severini, F., Toma, L. y cols. (2016). Experimental studies of susceptibility of Italian *Aedes albopictus* to Zika virus. *Eurosurveillance*; 21(18).
- Diallo, M., Laganier, R. y Nangouma, A. (2010). First record of *Ae. albopictus* (Skuse 1894), in Central African Republic. *Tropical Medicine & International Health*;15(10): 1185–1189.
- Dias, C.N. y Moraes, D.F. (2014). Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. *Parasitology Research*; 113: 565–592.
- Díaz San Andrés, A. (2011-2016). Disponible el 5/5/2018 en: <http://biogeografia.net.au.net/bioclimate7.html>
- Díaz-Menéndez, M., de la Calle-Prieto, F., Montero, D. y cols. (2016). Initial experience with imported Zika virus infection in Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*; 36(1): 4-8.
- Dickerson, C.Z. (2007). The effects of temperature and humidity on the eggs of *Aedes aegypti* (L.) and *Ae. albopictus* (Skuse) in Texas. Tesis doctoral. Texas A&M University.
- Dieng, H., Saifur Rahman, G.M., Abu Hassan, A. y cols. (2012). The effects of simulated rainfall on immature population dynamics of *Ae. albopictus* and female oviposition. *International Journal of Biometeorology*; 56: 113–120.
- Dong, Y., Morton, J.C., Ramirez, J.L. y cols. (2012). The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* activate toll and JAK-STAT pathway-controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*; 42: 126-132.
- Doucoure, S., Mouchet, F., Cornelie, S. y cols. (2012). Evaluation of the human IgG antibody response to *Aedes albopictus* saliva as a new specific biomarker of exposure to vector bites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 6(2):e1487.
- Dowling, Z., Armbruster, P., LaDeau, S.L. y cols. (2013). Linking mosquito infestation to resident socioeconomic status, knowledge, and source reduction practices in suburban Washington, DC. *Ecohealth*; 10: 36–47.
- Dritsou, V., Topalis, P., Windbichler, N. y cols. (2015). A draft genome sequence of an invasive mosquito: an Italian *Ae. albopictus*. *Pathogens and Global Health*; 109(5): 207-220.
- Dubrulle, M., Mousson, L., Moutailler, S. y cols. (2009). Chikungunya Virus and *Aedes* mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. *PLoS ONE*; 4(6): e5895.
- Duffy, M.R., Chen, T.H., Hancock, W.T. y cols. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England journal of medicine*; 360(24): 2536-2540.
- Dupanloup, I., Schneider, S., Excoffier, L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*; 11: 2571–2581.
- Dutra, H. L. C., Rocha, M. N., Dias, F. B. S. y cols. (2016). *Wolbachia* blocks currently circulating zika virus isolates in brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. *Cell Host & Microbe*; 19(6): 771–774.
- Dye, C. (1992). The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. *Annual Review of Entomology*; 37: 1-19.
- Eads, R. B. (1972). Recovery of *Aedes albopictus* from used tires shipped to United States ports. *Mosquito News*; 32: 113-114.

- Echeverría, F. (2006). Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. Tesis de Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología. pp 105.
- Egizi, A., Kiser, J., Abadam, C. y cols. (2016). The hitchhiker's guide to becoming invasive: Exotic mosquitoes spread across a US state by human transport not autonomous flight. *Molecular Ecology*; 25(13): 3033-3047.
- Eiras, A.E., Buhagiar, T.S. y Ritchie, S.A. (2014). Development of the gravid *Aedes* trap for the capture of adult female container-exploiting mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*; 51: 200-209.
- Englbrecht, C., Gordon, S., Venturelli, C. y cols. (2015). Evaluation of BG-Sentinel trap as a management tool to reduce *Aedes albopictus* nuisance in an urban environment in Italy. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 31: 16-25.
- Entente Départementale pour la Démoustication (EID) Disponible el 5/5/2018 en: <http://www.moustiquetigre.org/>
- Eritja, R. (2013). Laboratory tests on the efficacy of VBC60035, a combined larvicidal formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* (strain AM65-52) and *Bacillus sphaericus* (strain 2362) against *Ae. albopictus* in simulated catch basins. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 29(3): 280-283.
- Eritja, R., Palmer, J.R.B., Roiz, D. y cols. (2017). Direct Evidence of Adult *Ae. albopictus* Dispersal by Car. *Scientific Reports. Nature*; 1-15.
- Erlanger, T.E., Keiser, J. y Utzinger, J. (2008). Effect of dengue vector control interventions on entomological parameters in developing countries: a systematic review and meta-analysis. *Medical and Veterinary Entomology*; 22: 203-221.
- Escartin, S. y Mariani, S. (2014). Evaluating the toxicity of oil of lemon eucalyptus, *Corymbia citriodora* (Hook.), against larvae of the Asian tiger mosquito and non-target fish and larval amphibians. *Anales de Biología*; 36: 97-105.
- Estrada Franco, J. y Craig, G.B. (1995). Biología, Relaciones con Enfermedades y Control de *Aedes albopictus*. 42-151. Washington: Cuaderno Técnico, OPS.
- Esu, E., Lenhart, A., Smith, L. y cols. (2010). Effectiveness of peridomestic space spraying with insecticide on dengue transmission; systematic review. *Tropical Medicine & International Health*; 15(5): 619-631.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2009). Development of *Aedes albopictus* risk maps. Technical Report. Available from: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/0905_ter_development_of_aedes_albopictus_risk_maps.pdf
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2017). *Ae. albopictus* - current known distribution in Europe, Abril 2017. Disponible en: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/Aedes-albopictus-current-known-distribution-europe-april-2017>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2012. The climatic suitability for dengue transmission in continental Europe. Technical Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/ter-climatic-suitablility-dengue.pdf>

- European Centre for Disease Prevention and Control. (ECDC). (2009). Vector control with a focus on *Aede*. European Centre for Disease Prevention. Development of *Ae. albopictus* risk maps. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2009. - See more at: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/mosquitoes/pages/Aedes-albopictus.aspx#sthash.Ltu3qUWU.dpuf>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (ECDC). (2012). <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/TER-Mosquito-surveillance-guidelines.pdf>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (ECDC). (2014). Guidelines for the surveillance of native mosquitoes in Europe. Disponible en: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/surveillance-of%20native-mosquitoes%20-guidelines.pdf>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (ECDC). (2017). Clusters of autochthonous chikungunya cases in Italy, first update -9 October 2017. Stockholm: ECDC; 2017.
- European Mosquito Control Association. (ECDC). (2011). Guidelines for the control of invasive mosquitoes and associated vector borne diseases on the European continent. First Draft.
- Facchinelli, L., Valerio, .L, Pombi, M. y cols. (2007). Development of a novel sticky trap for container-breeding mosquitoes and evaluation of its sampling properties to monitor urban populations of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*; 21:183-195.
- Failloux, A.B., Vazeille-Falcoz, M., Mousson, L. y cols. (1999). Contrôle génétique de la compétence vectorielle des moustiques du genre *Aedes*. Journée SPE du 13 octobre 1999 à l'Institut Pasteur à Paris: Génétique et maladies infectieuses dans l'environnement tropical.
- Faraji, A., Egizi, A., Fonseca, D.M. y cols. (2014). Comparative host feeding patterns of the Asian tiger mosquito *Ae. albopictus*, in urban and suburban Northeastern USA and implications for disease transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 8: e3037.
- Farajollahi, A., Healy, S.P., Unlu, I. y cols. (2012). Effectiveness of ultra-low volume nighttime applications of an adulticide against diurnal *Aedes albopictus*, a critical vector of dengue and chikungunya viruses. *PLoS ONE*; 7:e49181.
- Farajollahi, A., Kesavaraju, B., Price, D.C. y cols. (2009). Field efficacy of BG-Sentinel and industry-standard traps for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and West Nile virus surveillance. *Journal of Medical Entomology*; 46: 919-925.
- Farenhorst, M., Knols, B.G.J., Thomas, M.B. (2010). Synergy in efficacy of fungal entomopathogens and permethrin against west african insecticide-resistant anopheles gambiae mosquitoes. *PLoS One*; 5(8): e12081.
- Fernandez-Garcia, M.D., Bangert, M., de Ory, F. y cols. (2016). Chikungunya virus infections among travellers returning to Spain, 2008 to 2014. *Eurosurveillance*; 21(36): 30336.
- Ferreira de Azara, T.M., Degener, C.M., Roque, R.A. y cols. (2013). The impact of CO2 on collection of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Culex quinquefasciatus* Say by BG-Sentinel (R) traps in Manaus, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 108: 229-232.

- Fischer, D., Thomas, S.M., Neteler, M. y cols. (2014). Climatic suitability of *Aedes albopictus* in Europe referring to climate change projections: comparison of mechanistic and correlative niche modelling approaches. *Eurosurveillance*; 19: 1-13.
- Flacio, E., Lüthy, P., Patocchi, N. y cols. (2004). Primo ritrovamento di *Ae. albopictus* in Svizzera. *Bollettino Della Società Ticinese di Scienze Naturali*; 92:141-142.
- Fonseca, D.M., Kaplan, L.R., Heiry, R.A. y cols. (2015). Density-dependent oviposition by female *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) spreads eggs among containers during the summer but accumulates them in the fall. *Journal of Medical Entomology*; 52(4): 705-712.
- Fonseca, D.M., Unlu, I., Crepeau, T. y cols. (2013). Area-wide management of *Ae. albopictus*. Part 2: gauging the efficacy of traditional integrated pest control measures against urban container mosquitoes. *Pest Management. Science*; 69(12): 1351-1361.
- Fontenille, D. y Toto, J.C. (2001). *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Skuse), a potential new Dengue vector in southern Cameroon. *Emerging Infectious Diseases journal*; 7(6): 1066-1067.
- Fontenille, D., Failloux, A.B. y Romi, R. (2007). Should we expect Chikungunya and Dengue in southern Europe? 169-184. En: *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe*. Edited by: Takken, W. y Knols, B.G.J. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Franco Aliaga, Tomás. (2010). *Geografía de España*. Madrid: Proyectos Córtydon. p. 19.
- Franz, A.W.E., Sanchez-Vargas, I., Adelman, Z.N. y cols. (2006). Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 103: 4198-4203.
- García-Munguía, A.M., Garza-Hernández, J.A., Rebollar-Tellez, E.A. y cols. (2011). Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites & Vectors*; 4:24.
- Gardner, L., Chen, N. y Sarkar, S. (2017). Vector status of *Aedes* species determines geographical risk of autochthonous Zika virus establishment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 11(3): 1-18.
- Garrett-Jones, C. (1964). The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bulletin of the World Health Organization*; 30:241-261.
- Garrido-Garduño, T. y Vázquez-Domínguez, E. (2013). Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista Mexicana de Biodiversidad*; 84(3): 1031-1054.
- Garza-Hernández, J., Rodríguez-Pérez, M. y Salazar, M.I. (2013). Vectorial Capacity of *Aedes aegypti* for Dengue Virus Type 2 is reduced with co-infection of *Metarhizium anisopliae*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 7(3): e2013.
- Garza-Hernández, J.A., Reyes-Villanueva, F., Russell, T.L. y cols. (2015). Copulation activity, sperm production and conidia transfer in *Aedes aegypti* males contaminated by *Metarhizium anisopliae*: A Biological Control Prospect. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015;9: 1-14.
- Gasperi, G., Bellini, R., Malacrida, A.R. y cols. (2012). A new threat looming over the Mediterranean basin: emergence of viral diseases transmitted by *Ae. albopictus* mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 6(9): e1836.

- Gatt, P., Deeming, J.C. y Schaffner, F. (2009). First records of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Malta. *European Mosquito Bulletin*; 27: 56-64.
- Georghiou, G.P. y Wirth, M.C. (1997). Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Applied Environmental Microbiology*; 63: 1095-1101.
- Gerónimo-Torres, J.C., Torres-De la Cruz, M., Perez-De la Cruz, M. y cols. (2016). Caracterización de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y su patogenicidad hacia *Hypothenemus hampei*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología*; 42 (1): 28-35.
- Gertsev, V.I. y Gertseva, V.V. (2004). Classification of mathematical models in ecology. *Ecological Modelling*; 178(3): 329-334.
- Gifex. Disponible el 5/5/2018 en: <http://www.gifex.com/images/0X0/2009-12-02-11304/Mapa-Fsico-de-Espaa.jpg>
- Giménez, N., Barahona, M., Casasa, A. y cols. (2007). Llegada de *Ae. albopictus* a España: un nuevo reto para la salud pública. *Gaceta Sanitaria*; 21: 25-28.
- Gjenero-Margan, I., Aleraj, B., Krajcar, D. y cols. (2011). Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Eurosurveillance*; 16 (9): 199-208.
- Global Invasive Species Database (2016). Disponible en: <http://www.iucngisd.org/gisd/search.php> on 13-10-2016
- Gomes, S.A., Paula, A.R., Ribeiro, A. y cols. (2015). Neem oil increases the efficiency of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Parasites & Vectors*; 8: 669.
- González, R., Montalvo, T., Camprubí, E. y cols. (2017). Casos confirmados de Dengue, Chikungunya y Zika en Barcelona capital durante el período de 2014 al 2016. *Revista Española de Salud Pública*; 91.
- González-Castillo, M., Aguilar, C.N. y Rodríguez- Herrera, R. (2012). Control de insectos plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuil*; 4(8).
- Göpfert, M.C., Briegel, H., y Robert, R. (1999). Mosquito hearing: sound-induced antennal vibrations in male and female *Aedes aegypti*. *The Journal of Experimental Biology*; 202: 2727-2738.
- Goubert, C., Minard, G., Vieira, C. y cols. (2016). Population genetics of the Asian tiger mosquito *Ae. albopictus*, an invasive vector of human diseases. *Heredity*; 117: 125-134.
- Gould, E.A., Gallian, P., De Lamballerie, X. y cols. (2010). First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clinical Microbiology & Infection*; 16(12): 1702-1704.
- Grandadam, M., Caro, V., Plumet, S. y cols. (2011). Chikungunya virus, southeastern France. *Emerging Infectious Diseases*; 17(5): 910-913.
- Grantham, A., Anderson, A.L. y Kelley, T. (2009). Door to door survey and community participation to implement a new county mosquito control program in Wayne County, North Carolina, USA. *International Journal of Environmental Research and Public Health*; 6: 2150-2159.

- Grard, G., Caron, M., Mombo, I.M. y cols. (2014). Zika virus in Gabon (Central Africa) – 2007: a new threat from *Ae. albopictus*? *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 8: 1–6.
- Grarock, K., Lindenmayer, D.B., Wood, J.T. y cols. (2012). Using invasion process theory to enhance the understanding and management of introduced species: A case study reconstructing the invasion sequence of the common myna (*Acridotheres tristis*). *Journal of Environmental Management*; 129: 398–409.
- Gratz, N.G. (2004). Critical review of the vector status of *Ae. albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*; 18(3): 215–227.
- Griffin, L.F. y Knight, J.M. (2012). A review of the role of fish as biological control agents of disease vector mosquitoes in mangrove forests: Reducing human health risks while reducing environmental risk. *Wetlands Ecology and Management*; 20: 243–252.
- Guasch, V.M. (2009). Caracterització de la població de mosquit tigre asiàtic (*Ae. albopictus*) al municipi de Rubí i anàlisi del impacte ambiental associat en el medi socioeconòmic. End-of-career project. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona.
- Guidi, V., Lehner, A., Luethy, P. y cols. (2013). Dynamics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Lysinibacillus sphaericus* spores in urban catch basins after simultaneous application against mosquito larvae. *PLoS ONE*; 8: e55658.
- Guillaumot, L., Ofanoa, R., Swillen, L. y cols. (2012). Distribution of *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in southwestern Pacific countries, with a first report from the Kingdom of Tonga. *Parasites & Vectors*; 5: 247.
- Habid, M.E. y Andrade, C.F. (1977). Epizootia em larvas de *Brassolis sophorae* (Linnaeus, 1758) causada por *Beauveria bassiana*, (Bals.) Vuil., com estudos de identificação e sintomatologia. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*; 6: 239–247.
- Haddad, N., Harbach, R.E., Chamat, S. y cols. (2007). Presence of *Aedes albopictus* in Lebanon and Syria. *Journal of the American Control Association*; 23:226–228.
- Halasa, Y.A., Shepard, D.S., Fonseca, D.M. y cols. (2014). Quantifying the impact of mosquitoes on quality of life and enjoyment of yard and porch activities in New Jersey. *PLoS ONE*; 9(3).
- Halasa, Y.A., Shepard, D.S., Wittemberg, E. y cols. (2012). Willingness-to-pay for an area-wide integrated pest management program to control the Asian tiger mosquito in New Jersey. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 28(3): 225–236.
- Hall, A.B., Basu, S., Jiang, X. y cols. (2015). A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*; 348(6240): 1268–1270.
- Halstead, S.B. y Papaevangelou, G. (1980). Transmission of dengue 1 and 2 viruses in Greece in 1928. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 29: 635–637.
- Hanson, S.M. y Craig, G.B.J. (1995). *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) eggs: field survivorship during northern Indiana winters. *Journal of medical entomology*; 32: 599–604.
- Harbach, R.E. y Knight, K.L. (1981). Corrections and additions to taxonomists glossary of Mosquito anatomy. *Mosquito Systematics*; 13 (2): 201–217.
- Harris, A.F., McKemey, A.R. y Nimmo, D. (2012). Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. *Nature Biotechnology*; 30: 828–830.

- Hartenstein, V. (2006). The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. *The Journal of Endocrinology*; 190(3): 555-570.
- Hawley, W. (1988). The Biology of *Ae. albopictus*. *Journal of American Mosquito Control Association*; 4: 2-39.
- Hawley, W.A., Pumpuni, C.B., Brady, R.H. y cols. (1989). Overwintering survival of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) eggs in Indiana. *Journal of Medical Entomology*; 26(2):122-129.
- Healy, K., Hamilton, G., Crepeau, T. y cols. (2014). Integrating the public in mosquito management: Active education by community peers can lead to significant reduction in peridomestic container mosquito habitats. *PLoS ONE*; 9(9): e108504.
- Heinig, R.L. y Thomas, M.B. (2015). Interactions between a fungal entomopathogen and malaria parasites within a mosquito vector. *Malaria Journal*; 14: 22.
- Heitmann, A., Jansen, S., Lühken, R. y cols. (2017). Experimental transmission of zika virus by mosquitoes from central Europe. *Eurosurveillance*; 22(2).
- Helinski, M.E. y Harrington, L.C. (2011). Male mating history and body size influence female fecundity and longevity of the dengue vector *Aedes aegypti*. *Journal of medical entomology*; 48: 202-211.
- Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L. y cols. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*; 34: 653-665.
- Higgs, S. y Beaty, B.J. (2005). Natural cycles of vector-borne pathogens. 167-185. En: *Biology of Disease Vectors*. 2nd Edition. Marquardt WC, editor. Elsevier Academic Press.
- Hoffmann, A.A., Perran, A.R. y Gordana, R. (2015). *Wolbachia* strains for disease control: ecological and evolutionary considerations. *Evolutionary Applications*; 8(8): 751-768.
- Holder, D.J., Kirkland, B.H., Lewis, M.W. y cols. (2007). Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana*. *Microbiology*; 153: 3448-3457.
- Honório, N.A., Silva, W.C., Leite, P.J. y cols. (2003). Dispersal of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 98(2): 191-198.
- Hotta, S. (1998). Dengue vector mosquitoes in Japan: The role of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* in the 1942-1944 dengue epidemics of Japanese Main Islands. *Medical Entomology and Zoology*; 49: 267-274.
- Huang, Y.M. (1968). Neotype designation for *Aedes* (*Stegomyia*) *albopicta* (Skuse) (Diptera: Culicidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*; 70(4): 297- 302.
- Huerta, H., González-Roldán, J.F., Sánchez-Tejeda, G. y cols. (2017). Detection of Zika virus in *Aedes* mosquitoes from Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 111(7): 328-331.
- Humber, R.A. (2008). Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*; 98: 262-266.
- Hurlbert, S.H. (1984). Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs*; 54(2): 187-211.
- IBM Corp. Released. (2010). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0.1 Armonk, NY: IBM Corp.

Instituto Geográfico Nacional. Disponible el 5/5/2018 en:
https://www.ign.es/espmap/mapas_clima_bach/Mapa_clima_13.htm

- Invasive Species Specialist Group. (ISSG). Global Invasive Species Database (2017): One hundred of the World's worst invasive alien species; 2011. Disponible en:
<http://www.iucngisd.org/gisd/search.php> on 20-05-2017
- Ismail, A.N., Dom, N.C., Ismail, R. y cols. (2015). Mitochondrial Cytochrome Oxidase I gene sequence analysis of *Ae. albopictus* in Malaysia. *Journal of American Mosquito Control Association*; 31(4): 305-312.
- Izri, A., Bitam, I. y Charrel, R.N. (2011). First entomological documentation of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) in Algeria. *Clinical Microbiology and Infection*; 17(7): 1116-1118.
- Jackson, J.C. y Robert, D. (2006). Nonlinear auditory mechanism enhances female sounds for male mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 103(45): 16734-16739.
- Johnston, C. (1855). Auditory apparatus of the *Culex* Mosquito. *Quarterly Journal of Microscopical Science*; 3: 97-102.
- Jones, J.C. y Wheeler, E.W. (1965). An analytical study coitus *Aedes aegypti*. *Journal of Morphology*; 117(3): 401-423.
- Jourdain, F., Roiz, D., Perrin, Y. y cols. (2015). Facteurs entomologiques d'émergence des arboviroses. *Transfusion Clinique et Biologique*; 22(3): 101-106.
- Juliano, S.A. y Lounibos, L.P. (2005). Ecology of invasive mosquitoes: Effects on resident species and on human health. *Ecology Letters*; 8: 558-574.
- Jupille, H., Seixas, G., Mousson, L. y cols. (2016). Zika Virus, a new threat for Europe? *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 10(8):e0004901.
- Kambhampati, S., Black, W.C. y Rai, K.S. (1991). Geographic origin of the US and Brazilian *Aedes albopictus* inferred from allozyme analysis. *Heredity*; 67:85-93.
- Kamgang, B., Brengues, C., Fontenille, D. y cols. (2011). Genetic structure of the tiger mosquito, *Ae. albopictus*, in Cameroon (Central Africa). *PLoS ONE*; 6(5): e20257.
- Kamgang, B., Nchoutpouen, E., Simard, F. y cols. (2012). Notes on the blood-feeding behavior of *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon. *Parasites & Vectors*; 5: 57.
- Kampango, A. y Abílio, A. P. (2016). The Asian tiger hunts in Maputo city. The first confirmed report of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1895) in Mozambique. *Parasites and Vectors*; 9: 4-7.
- Kampen, H., Kronefeld, M., Zielke, D. y cols. (2013). Further specimens of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) trapped in southwest Germany. *Parasitology Research*; 112: 905-907.
- Kay, B. y Nam, V.S. (2005). New strategy against *Aedes aegypti* in Vietnam. *Lancet*; 365: 613-617.
- Kelvin, A.A. (2011). Outbreak of Chikungunya in the Republic of Congo and the global picture. *Journal of infection in developing countries*; 5(6):441- 444.
- Klayman, D.L. (1985). Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*; 228: 1049-1055.

- Kline, D.L. (2007). Semiochemicals, traps/targets and mass trapping technology for mosquito management. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 23: 241–251.
- Klobučar, A., Merdić, E., Benić, N. y cols. (2006). First record of *Aedes albopictus* in Croatia. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 22(1): 147-148.
- Knols, B.G., Bukhari, T. y Farenhorst, M. (2010). Entomopathogenic fungi as the next-generation control agents against malaria mosquitoes. *Future Microbiology*; 5: 339-341.
- Knudsen, A. B., Romi, R. y Majori, G.(1996). Occurrence and spread in Italy of *Aedes albopictus*, with implications for its introduction into other parts of Europe. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 12: 177-183.
- Koch, L.K., Cunze, S., Werblow, A. y cols. (2016). Modeling the habitat suitability for the arbovirus vector *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae) in Germany. *Parasitology Research*. 115: 957-964.
- Koella, L.C. y Sorensen, F.L. (2002). Effect of adult nutrition on the melanization immune response of the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Medical and Veterinary Entomology*; 16: 316-320.
- Kolar, C.S. y Lodge, D.M. (2001). Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends in Ecology & Evolution*; 16(4): 199-204.
- Konishi, E. (1989). *Culex tritaeniorhynchus* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) as natural vectors of *Dirofilaria immitis* (Spirurida: Filariidae) in Miki City, Japan. *Journal of Medical Entomology*; 26: 294-300.
- Köppen, W. (1918). Klassifikation der Klimate nach Temperatur, Niederschlag und Jahreslauf. *Petermanns Geogr. Mitt*; 64: 193-203.
- Kostál, V. (2006). Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology*; 52: 113-127.
- Kotsakiozi, P., Richardson, J.B., Pichler, V. y cols. (2017). Population genomics of the Asian tiger mosquito, *Ae. albopictus*: insights into the recent worldwide invasion. *Ecology and Evolution*; 7: 10143-10157.
- Kryukov, V.Y., Yaroslavtseva, O.N., Levchenko, M.V. y cols. (2010). Phenotypic variability of environmental isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*; 79: 265-269.
- Kumar, R. y Hwang, J.S. (2006). Larvicidal efficiency of aquatic predators: A perspective for mosquito biocontrol. *Zoological Studies*; 45: 447-466.
- La Ruche, G., Souares, Y., Armengaud, A. y cols. (2010). First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Eurosurveillance*; 15(39): 19676.
- Labbé, G.M.C., Scaife, S., Morgan, S.A. y cols. (2012). Female-specific flightless (fsRIDL) phenotype for control of *Aedes albopictus*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*; 6: e1724.
- Lacey, L.A. (2017). Microbial control of medically important mosquitoes in tropical climates. 409-430. En: *Microbial control of insect and mite pests. From Theory to Practice*. Elsevier Inc.
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I. y cols. (2001). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*; 132: 1-41.
- Lacour, G., Chanaud, L., L'Ambert, G. y cols. (2015). Seasonal synchronization of diapause phases in *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae). *PLoS ONE*; 10(12): e0145311.

- Lacour, G., Vernichon, F., Cadilhac, N. y cols. (2014). When mothers anticipate: Effects of the pre-diapause stage on embryo development time and of maternal photoperiod on eggs of a temperate and a tropical strains of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Physiology*; 71: 87-96.
- Lacroix, R., Delatte, H., Hue, T. y cols. (2009). Dispersal and survival of male and female *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island. *Journal of Medical Entomology*; 46: 1117-1124.
- Lacroix, R., McKemey, A.R., Raduan, N. y cols. (2012). Open Field Release of Genetically Engineered Sterile Male *Aedes aegypti* in Malaysia. *PLoS ONE*; 7(8): e42771.
- Lafri, I., Bitam, I., Beneldjouzi, A. y cols. (2014). An inventory of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Algeria. *Bulletin de la Société Zoologique de France*; 139: 255-261.
- Laird, M., Calder, L., Thornton, R.C. y cols. (1994). Japanese *Aedes albopictus* among four mosquito species reaching New Zealand in used tires. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 10(1): 14-23.
- Lamb, C.G. (1922). The geometry of insect pairing. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Science*; 94:1-11.
- Lee, C., Vythilingam, I., Chong, C.S. y cols. (2013). Gravitraps for management of dengue clusters in Singapore. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 88: 888-892.
- Lee, R.M., Choong, C.T., Goh, B.P. y cols. (2014). Bioassay and biochemical studies of the status of pirimiphos-methyl and cypermethrin resistance in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore. *Tropical Biomedicine*; 31:670- 679.
- Lee, S.J., Kim, S., Yu, J.S. y cols. (2015). Biological control of Asian tiger mosquito, *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) using *Metarhizium anisopliae* JEF-003 millet grain. *Journal of Asia-Pacific Entomology*; 18: 217-221.
- Leisnham, P.T., Towler, L. y Juliano, S.A. (2011). Geographic variation of photoperiodic diapause but not adult survival or reproduction of the invasive mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in North America. *Annals of the Entomological Society of America*; 104: 1309-1318.
- Leisnham, P.T., Towler, L., y Juliano, S.A. (2011). Geographic Variation of Photoperiodic Diapause but Not Adult Survival or Reproduction of the Invasive Mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in North America. *Annals of the Entomological Society of America*; 104(6), 1309-1318.
- Leles, R.N., Sousa, N.A., Rocha, L.F.N. y cols. (2010). Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*; 107: 1271-1274.
- Librado, P. y Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*; 25: 1451-1452.
- Liu, Z., Zhou, T., Lai, Z. y cols. (2017). Competence of *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes as Zika Virus vectors, China. *Emerging Infectious Diseases*; 23(7):1085-1091.
- Lizzi, K.M., Qualls, W.A., Brown, S.C. y cols. (2014). Expanding integrated vector management to promote healthy environments. *Trends Parasitology*; 30(8): 394-400.

- Lloyd's list. (2016). Top 100 container ports. Disponible el 27/03/2018 en: <https://lloydslist.maritimeintelligence.informa.com/one-hundred-container-ports-2016#row>
- Loaiza, J.R., Bermingham, E., Sanjur, O.I. y cols. (2012). Review of genetic diversity in malaria vectors (Culicidae: Anophelinae). *Infection, genetics and evolution. Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*; 12: 1-12.
- Lockwood, J.L., Cassey, P. y Blackburn, T. (2005). The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution*; 20(5): 223-228.
- López-Fernández, M.L., Piñas, S. y López F, M.S. (2008). Macroclimas, Bioclimas y variantes bioclimáticas de la España Peninsular y Balear, y su cartografía. Publicaciones de Biología, Universidad de Navarra, Serie Botánica: 17; 229-236.
- Lounibos, L.P. (2002). Invasions by insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*; 47: 233-266.
- Low, V.L., Vinnie-Siow, W.Y., Lim, Y.A.L. y cols. (2015). First molecular genotyping of A302S mutation in the gamma aminobutyric acid (GABA) receptor in *Aedes albopictus* from Malaysia. *Tropical Biomedicine*; 32: 554-556.
- Lucientes-Curdi, J., Molina-Moreno, R., Amela-Heras, C. y cols. (2014). Dispersion of *Ae. albopictus* in the Spanish Mediterranean area. *European Journal of Public Health*; 24: 637-640.
- Luque, A. (2011). Micología. Centro de Referencia de Micología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR.
- Macdonald, G. (1952a). The analysis of equilibrium in malaria. *Tropical Diseases Bulletin*; 49: 813-828.
- Macdonald, G. (1952b). The analysis of the sporozoite rate. *Tropical Diseases Bulletin*; 49: 569-585.
- Madon, M.B., Mulla, M.S., Shaw, M.W. y cols. (2002). Introduction of *Ae. albopictus* (Skuse) in southern California and potential for its establishment. *Journal of Vector Ecology*; 27: 149-154.
- Maheswaran, R. y Ignacimuthu, S. (2012). A novel herbal formulation against dengue vector mosquitoes *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Parasitology Research*; 110: 1801-1813.
- Manica, M., Filipponi, F., D' Alessandro, A. y cols. (2016). Spatial and temporal hot spots of *Aedes albopictus* abundance inside and outside a South European metropolitan area. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 10(6): e0004758.
- Manica, M., Guzzeta, G., Poletti, P. y cols. (2017). Transmission dynamics of the ongoing chikungunya outbreak in Central Italy: from coastal areas to the metropolitan city of Rome, summer 2017. *Eurosurveillance*; 22(44).
- Manni M, Guglielmino CR, Scolari F, Vega-Rúa A, Failloux AB, Somboon P, et al. Genetic evidence for a worldwide chaotic dispersion pattern of the arbovirus vector, *Ae. albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 11.
- Manni, M., Gomulski, L.M., Aketarawong, N. y cols. (2015). Molecular markers for analyses of intraspecific genetic diversity in the Asian Tiger mosquito, *Ae. albopictus*. *Parasites & Vectors*; 8:188.

- Marabuto, E. y Rebelo, M.T. The Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse, 1894), a vector of dengue, chikungunya and zika, reaches Portugal. *BioRxiv*.
- Marchand, E., Prat, C., Jeannin, C. y cols. (2013). Autochthonous case of dengue in France, October 2013. *Eurosurveillance*; 18(50): 20661.
- Marini, F., Caputo, B., Pombi, M. y cols. (2010). Study of *Ae. albopictus* dispersal in Rome, Italy, using sticky traps in mark-release-recapture experiments. *Medical and Veterinary Entomology*; 24: 361-368.
- Marquetti, M.C., Saint Jean, M.Y., Fuster, C.A. y cols. (2012). The first report of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* in Haiti. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*; 107(2): 279-281.
- Marshall, J.M. (2010). The Cartagena Protocol and genetically modified mosquitoes. *Nature Biotechnology*.
- Marten, G.G. (1990). Elimination of *Ae. albopictus* from tire piles by introducing *Macrocyclops albidus* (Copepoda, Cyclopidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*; 6: 689-693.
- Marten, G.G. y Reid, J.W. (2007). Cyclopoid copepods. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 23: 65-92.
- Maurer, P., Couteadier, Y., Girard, P.A. y cols. (1997a). Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycological Research*; 101: 159-164.
- Maynard, A.J., Ambrose, L., Cooper, R.D. y cols. (2017). Tiger on the prowl: Invasion history and spatio-temporal genetic structure of the Asian tiger mosquito *Ae. albopictus* (Skuse 1894) in the Indo-Pacific. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 11: 1-27.
- McGraw, E.A. y O'Neill, S.L. (2013). Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature Reviews Microbiology*; 11: 181-193.
- McMeniman, C.J., Lane, R.V., Cass, B.N. y cols. (2009). Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*; 323:141-144.
- Medley, K.A., Jenkins, D.G. y Hoffman, E.A. (2015). Human-aided and natural dispersal drive gene flow across the range of an invasive mosquito. *Molecular Ecology*; 24(2): 284-295.
- Medlock, J.M., Hansford, K.M., Schaffner, F. y cols. (2012). A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector-Borne Zoonotic Diseases*; 12: 435-447.
- Medlock, J.M., Hansford, K.M., Versteirt, V. y cols. (2015). An entomological review of invasive mosquitoes in Europe. *Bulletin of Entomological Research*; 105(6): 637-663.
- Medlock, J.M., Vaux, A.G., Cull, B. y cols. (2017). Detection of the invasive mosquito species *Ae. albopictus* in southern England. *The Lancet Infectious Diseases*; 17: 140.
- Meigen, J.W. (1818). Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten. Bei Friedrich Wilhelm Forstmann: bei Beaufort Sohn.
- Melero-Alcázar, R., Tello, A., Marino, E. y cols. (2017). *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera, Culicidae) primera cita para la Comunidad de Madrid, España. *Boletín de la Asociación Española de Entomología*; 41 (3-4): 515-519.
- Mellor, P.S., Boorman, J. y Baylis, M. (2000). Culicoides biting midges: Their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology*; 45(1): 307-340.

- Mendonca de Santos, E.M., Varjal de Melo-Santos, M.A., Fontes de Oliveira, C.M. y cols. (2012). Evaluation of a sticky trap (*AedesTraP*), made from disposable plastic bottles, as a monitoring tool for *Aedes aegypti* populations. *Parasites & Vectors*; 5:195.
- Mendoza, R., y P. Koleff.(2014). Introducción de especies exóticas acuáticas en México y en el mundo, en R. Mendoza y P. Koleff (coords.). *Especies acuáticas invasoras en México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp. 17-41.
- Meyer, R.P. (1989). Estimation of vectorial capacity: Pathogen extrinsic incubation and vector competence. *Bulletin of the Society for Vector Ecology*; 14(1): 60-66.
- Meyerson, L.A. y Mooney, H.A. (2007). Invasive alien species in an era of globalization. *Frontiers in Ecology and the Environment*; 5(4): 199-208.
- Mikami, A. y Yamashita, N. (2004). The inhibitory effects of a neem formulation on emergence of *Ochlerotatus japonicus* and *Culex pipiens pallens*. *Medical Entomology and Zoology*; 55: 239-242.
- Mikery-Pacheco, O., Serrano-Domínguez, K., Marcelín-Chong, P. y cols. (2015). Efficiency of the separation of *Aedes (Stegomyia) Albopictus* (Diptera : Culicidae) male and female pupae using a sieving device. *Acta Zoologica Mexicana*; 31(1): 113-115.
- Millet, J.P., Montalvo, T., Bueno-Marí, R. y cols. (2017). Imported Zika virus in a European city: How to prevent local transmission? *Frontiers in Microbiology*; 8:1319.
- Minard, G., Tran, F.H., Van, V.T. y cols. (2015). French invasive Asian tiger mosquito populations harbor reduced bacterial microbiota and genetic diversity compared to Vietnamese autochthonous relatives. *Frontiers in Microbiology*; 6: 1-15.
- Ministerio Asuntos Exteriores. (2017). Ficha País. Madagascar. Oficina de Información Diplomática. Disponible el 27/03/2018 en URL: http://www.exteriores.gob.es/Documents/FichasPais/madagascar_ficha%20pais.pdf
- Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. (MSSSI). (2016). Plan nacional de preparación y respuesta frente a enfermedades vectores Parte I : Dengue, Chikungunya y Zika.
- Mnyone, L.L., Kirby, M.J., Mpingwa, M.W. y cols. (2011). Infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes with entomopathogenic fungi: effect of host age and blood-feeding status. *Parasitology Research*; 108: 317-322.
- Mogi, M., Armbruster, P., Tuno, N. y cols. (2015). Simple indices provide insight to climate attributes delineating the geographic range of *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) prior to worldwide invasion. *Journal of Medical Entomology*; 52: 647-57.
- Montero-Pau, J., Gómez, A. y Muñoz, J. (2008). Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. *Limnology and Oceanography: Methods*; 6: 218-222.
- Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Avances en el fomento de productos fitosanitarios no-sintéticos. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*; 63: 95-103.
- Moore, C.G. (1999). *Aedes albopictus* in the United States: current status and prospects for further spread. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 15: 221-227.
- Moore, C.G. y Mitchell, C.J. (1997). *Ae. albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. *Emerging Infectious Diseases*; 3(3): 329-334.

- Morales-Vargas, R.E., Phumala-Morales, N., Tsunoda, T. y cols. (2013). The phenetic structure of *Aedes albopictus*. *Infection, Genetics and Evolution*; 13: 242-251.
- Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J.A. y cols. (2009). A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*; 139(7): 1268–1278.
- Morrone, J.J. (2009). Evolutionary biogeography. An integrative approach with cases studies. 304. New York: Columbia University Press.
- Mount, G. (1998). A critical review of ultralow-volume aerosols of insecticide applied with vehicle-mounted generators for adult mosquito control. *Journal of the American Control Association*; 14(3): 305-334.
- Mousson, L., Dauga, C., Garrigues, T. y cols. (2005). Phylogeography of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genetics Research*; 86: 1-11.
- Mousson, L., Zouache, K., Arias-Goeta, C. y cols. (2012). The native *Wolbachia* symbionts limit transmission of dengue virus in *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 6(12): e1989.
- Muñoz, J., Eritja, R., Alcaide, M. y cols. (2011). Host-feeding patterns of native *Culex pipiens* and invasive *Ae. albopictus* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in urban zones from Barcelona, Spain. *Journal of Medical Entomology*; 48: 956–960.
- Murdock, C.C., Evans, M.V., McClanahan, T.D. y cols. (2017). Fine-scale variation in microclimate across an urban landscape shapes variation in mosquito population dynamics and the potential of *Ae. albopictus* to transmit arboviral disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*; 11(5): e0005640.
- Nam, V.S., Yen, N.T., Duc, H.M. y cols. (2012). Community-based control of *Aedes aegypti* by using *Mesocyclops* in Southern Vietnam. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 86:850–859.
- Nayar, J.K. y Knight, J.W. (1999). *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): an experimental and natural host of *Dirofilaria immitis* (Filarioidea: Onchocercidae) in Florida, U.S.A. *Journal of Medical Entomology*; 36: 441-448.
- Niebylski, M.L. y Meek, C.L.(1992). Blood-feeding of *Culex* mosquitoes in an urban environment. *Journal of the American Control Association*; 8(2):173-177.
- Nuttall, P.A., Jones, L.D. y Davies, C.R. (1991). The role of arthropod vectors in arbovirus evolution. 15-45. En: *Advances in disease vector research*. Vol 8. New York: Springer.
- Ogata, K. y López-Samayoa, A. (1996). Discovery of *Aedes albopictus* in Guatemala. *Journal of the American Control Association*; 12(3): 503-506.
- Ohba, S.Y., Ohashi, K., Pujiyati, E. y cols. (2013). The effect of pyriproxyfen as a population growth regulator against *Aedes albopictus* under semi-field conditions. *PLoS ONE*; 8:e67045.
- Oliva, C.F., Damiens, D., Vreysen, M.J.B. y cols. (2013). Reproductive strategies of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and implications for the sterile insect technique. *PLoS ONE*; 8: e78884.
- Ondiaka, S.N., Masinde, E.W., Koenraad, C.J.M. y cols. (2015). Effects of fungal infection on feeding and survival of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) on plant sugars. *Parasites & Vectors*; 8: 35.

- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2005). Reglamento Sanitario Internacional. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246186/9789243580494-spa.pdf;jsessionid=9CA69AFC9C00E6513DD6D1A4BD90C80B?sequence=1> Accedido 27-04-2018
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2006). El zika: el origen y la propagación de un virus transmitido por mosquitos.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2009). Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. La Paz, Bolivia: OMS.
- Ortiz-Urquiza, A. y Keyhani, N.O. (2013). Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*; 4: 357-374.
- Ortiz-Urquiza, A., Riveiro-Miranda, L., Santiago-Álvarez, C. y cols. (2010). Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*; 105: 270-278.
- Pagá, A., Míguez, A., Salazar, A. y cols. (2015). Vigilancia de enfermedades de transmisión vectorial. En: Viure en Salut 105. Ed: Direcció General de Salut Pública. Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública. Generalitat. Mosquit tigre i salut: 11-12.
- Pagès, F., Peyrefitte, C.N., Mve, M.T. y cols. (2009). *Ae. albopictus* Mosquito: The Main Vector of the 2007 Chikungunya Outbreak in Gabon. *PLoS ONE*; 4(3): e4691.
- PAHO/WHO. (2016). Zika. Epidemiological Update. (http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=34243&lang=en).
- Palmer, J.R.B., Oltra, A., Collantes, F. y cols. (2017). Citizen science provides a reliable and scalable tool to track disease-carrying mosquitoes. *Nature Communications*; 8(1).
- Patterson, R.S., Weidhaas, D.E., Ford, H.R. y cols. (1970). Suppression and elimination of an island population of *Culex pipiens quinquefasciatus* with sterile males. *Science*; 168: 1368-1370.
- Patz, J.A. y Olson, S.H. (2006). Climate change and health: global to local influences on disease risk. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*; 100(5-6): 535-549.
- Paula, A.R., Brito, E.S., Pereira, C.R. y cols. (2008). Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: Prospects for Dengue vector control. *Biocontrol Science and Technology*; 18: 1017-1025.
- Paula, A.R., Carolino, A.T., Silva, C.P. y cols. (2011). Susceptibility of adult female *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding. *Parasites & Vectors*; 4: 91.
- Paula, A.R., Carolino, A.T., Silva, C.P. y cols. (2013). Efficiency of fungus impregnated black cloths combined with Imidacloprid for the control of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Letters in Applied Microbiology*; 57(2): 157-163.
- Paula, A.R., Carolino, A.T., Silva, C.P. y cols. (2013). Testing fungus impregnated cloths for the control of adult *Aedes aegypti* under natural conditions. *Parasites & Vectors*; 6:256.
- Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L. y cols. (2009). *Ae. albopictus*, an arbovirus vector : From the darkness to the light. *Microbes and Infection*; 11: 1177-1185.
- Pener, H., Wilamowski, A., Schnur, H. y cols. (2003). Letter to the Editors. *European Mosquito Bulletin*; 14:32.

- Peña, C.J. (1993). First report of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) from the Dominican Republic. *Vector Ecology*; 24(4): 4-5.
- Pereira, C.R., Paula, A.R., Gomes, S.A. y cols. (2009). The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Biocontrol Science and Technology*; 19: 881-886.
- Perfectti, F., Picó, F.X. y Gómez, J.M. (2009). La huella genética de la selección natural. *Ecosistemas*; 18 (1): 10-16.
- Petric, D., Pajovic, I., Ignjatovic, A. y cols. (2001). *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) new mosquito species (Diptera, Culicidae) in the entomofauna of Yugoslavia. 29. En: Proceedings, Symposia of Serbian Entomologists, 26-29 September 2001, Belgrade. Entomological Society of Serbia, Belgrade, Goč-Serbia.
- Petrić, D., Zgomba, M., Ignjatović, A. y cols. (2006). Invasion of the *Stegomyia albopicta* to a part of Europe. Presentation at the 15th European Society for Vector Ecology Meeting, 10-14 April 2006, Serres, Greece.
- Phasomkusolsil, S., Tawong, J., Monkanna, N. y cols. (2013). Maintenance of mosquito vectors: effects of blood source on feeding, survival, fecundity, and egg hatching rates. *Journal of Vector Ecology*; 38: 38-45.
- Phuc, H., Andreasen, M.H., Burton, R.S. y cols. (2007). Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biology*; 5(1): 11.
- Pik-kheng H., Choon, J. B., Kadir, J. y cols. (2009). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Deuteromycetina: Hyphomycete) Isolates and their effects on subterranean Termite *Coptotermes curvignathus* (Isoptera: Rhinotermitide). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*; 4(4):289-297.
- Pinnock, D.E., Garcia, R. y Cubbin, C.M. (1973). *Beauveria tenella* as a control agent for mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*; 22: 143-147.
- Piñero, D., Caballero-Mellado, J., Cabrera-Toledo, D. y cols. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. 437- 494. En Capital natural de México, vol. I : Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México.
- Pluskota, B., Storch, V., Braunbeck, T. y cols. (2008). First record of *Stegomyia albopicta* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Germany. *European Mosquito Bulletin*; 26: 1-5.
- Poletti, P., Messeri, G., Ajelli, M. y cols. (2011). Transmission potential of chikungunya virus and control measures: the case of Italy. *PLoS ONE*; 6:e18860.
- Ponlawat, A. y Harrington, L.C. (2005). Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. *Journal of Medical Entomology*; 42: 844-849.
- Porretta, D., Mastrantonio, V., Bellini, R. y cols. (2012). Glacial history of a modern invader : Phylogeography and species distribution modelling of the asian tiger mosquito *Ae. albopictus*. *Trends in Ecology & Evolution*; 16(4): 199-204.
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*; 25(7):1253-1256.
- Pratt, J.J., Helenick, R.H., Harrison, J.B. y cols. (1946). Tires as a factor in the transportation of mosquitoes by ships. *Military Surgeon*; 99: 785-788.

- Pucheta- Díaz, M., Flores A., Rodríguez S. y cols. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*; 31(12): 856-860.
- Rai, K.S. (1963). A comparative study of mosquito karyotypes. *Annals of the Entomological Society of America*; 56(2): 160-170.
- Ravi, V. (2006). Re-emergence of Chikungunya virus in India. *Indian Journal of Medical Microbiology*; 24: 83-84.
- Reinert, J.F., Harbach, R.E. y Kitching, I.J. (2009). Phylogeny and classification of tribe Aedini (Diptera: Culicidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*; 157: 700-794.
- Reisen, W.K. (1989a). Estimation of vectorial capacity: Introduction. *Bulletin of the Society for Vector Ecology*; 14(1): 39-40.
- Reisen, W.K. (1989b). Estimation Of Vectorial Capacity: Relationship to disease transmission by malaria and arbovirus vectors. *Bulletin of the Society for Vector Ecology*; 14(1): 39-40.
- Reiskind, M.H. y Zarrabi, A.A. (2011). The importance of an invasive tree fruit as a resource for mosquito larvae. *Journal of Vector Ecology*; 36: 197-203.
- Reiter, P. (2016). Control of urban Zika vectors: should we return to the successful strategy? *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 10(6):e0004769.
- Reiter, P. y Sprenger, D. (1987). The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *Journal of American Mosquito Control Association*; 3: 494-501.
- Reiter, R. y Darsie, R.F. Jr. (1984). *Aedes albopictus* in Memphis, Tennessee (USA): an achievement of modern transportation? *Mosquito News*; 44: 396-399.
- Revay, E.E., Mueller, G.C., Qualls, W.A. y cols. (2014). Control of *Ae. albopictus* with attractive toxic sugar baits (ATSB) and potential impact on non-target organisms in St Augustine, Florida. *Parasitology Research*; 113: 73-79.
- Reyes-Villanueva, F., Garza-Hernandez, J., Garcia-Munguia, A.M. y cols. (2011). Dissemination of *Metarhizium anisopliae* of low and high virulence by mating behavior in *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*; 4 (1).
- Reynolds, J.A., Poelchau, M.F., Rahman, Z. y cols. (2012). Transcript profiling reveals mechanisms for lipid conservation during diapause in the mosquito, *Ae. albopictus*. *Journal of Insect Physiology*; 58: 966-973.
- Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R. y cols. (2007). Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*; 370: 1840-1846.
- Richards, S.L., Apperson, C.S., Ghosh, S.K. y cols. (2006). Spatial analysis of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) oviposition in suburban neighborhoods of a Piedmont Community in North Carolina. *Journal of Medical Entomology*; 43(5): 976-989.
- Richards, S.L., Ghosh, S.K., Zeichner, B.C. y cols (2008). Impact of source reduction on the spatial distribution of larvae and pupae of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in suburban neighborhoods of a Piedmont community in North Carolina. *Journal of Medical Entomology*; 45: 617-628.
- Rigau-Pérez, J.G. (1998). The early use of break-bone fever (Quebrantahuesos, 1771) and dengue (1801) in Spanish. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 59: 272-274.

- Ritchie, S.A., Moore, P., Carruthers, M. y cols. (2006). Discovery of a widespread infestation of *Aedes albopictus* in the Torres Strait, Australia. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 22: 358-365.
- Rivas Martínez, S. (1983). Pisos bioclimáticos de España. *Lazaroa* 5, pp:33-43, Madrid.
- Roche, B., Léger, L., L'Ambert, G. y cols. (2015). The spread of *Aedes albopictus* in Metropolitan France: Contribution of environmental drivers and human activities and predictions for a near future. *PLoS One*; 10(5): e0125600.
- Rocklöv, J., Quam, M.B., Sudre, B. y cols. (2016). Assessing seasonal risks for the introduction and mosquito-borne spread of zika virus in Europe. *EBioMedicine*; 9: 250-256.
- Rogers, D.J. y Packer, M.J. (1993). Vector-borne diseases, models, and global change. *The Lancet*; 342: 1282-1284.
- Roiz, D., Boussès, P., Simard, F. y cols. (2015). Autochthonous Chikungunya transmission and extreme climate events in southern France. *PLOS Neglected Tropical Diseases*; 9: e0003854.
- Roiz, D., Duperier, S., Roussel, M. y cols. (2016). Trapping the tiger : efficacy of the novel BG-Sentinel 2 With several attractants and carbon dioxide for collecting *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae) in southern France. *Journal of Medical Entomology*; 53(2): 460-465.
- Roiz, D., Eritja, R., Melero-Alcíbar, R. y cols. (2007). Distribución de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera, Culicidae) en España. *Boletín la Sociedad Entomológica Aragonesa*; 40: 523-526.
- Roiz, D., Rosa, R., Arnoldi, D. y cols. (2010). Effects of temperature and rainfall on the activity and dynamics of host-seeking *Ae. albopictus* females in northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Diseases*; 10(8):811-816.
- Romi, R., Di Luca, M. y Majori, G. (1999). Current status of *Ae. albopictus* and *Aedes atropalpus* in Italy. *Journal of the American Control Association*; 15(3):425-427.
- Romi, R., Severini, F. y Toma, L. (2006). Cold acclimation and overwintering of female *Aedes albopictus* in Roma. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 22(1): 149-151.
- Rossi, G.C., Pascual, N.T. y Krsticevic, F.J. (1999). First record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina. *Journal of the American Control Association*; 15(3): 422.
- Roth, L.M. (1948). A study of mosquito behavior. An experimental laboratory study of the sexual behavior of *Aedes aegypti* (Linneus). *The American Midland Naturalist*; 40: 265-352.
- Rozeboom, L.E., Rosen, L. y Ikeda, J. (1973). Observation on oviposition by *Aedes* (S.) *albopictus* Skuse and *Ae.* (S) *polynesiensis* marks in nature. *Journal of Medical Entomology*; 10: 397-399.
- Sabatini, A., Raineri, V., Trovato, G. y cols. (1990) *Aedes albopictus* in Italy and possible diffusion of the species into the Mediterranean area. *Parassitologia*; 32(3): 301-304.
- Sakai, A.K., Allendorf, F.W., Holt, J.S. y cols (2001). The population biology of Invasive Species. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*; 32: 305-332
- Salazar, M.I., Richardson, J.H., Sánchez-Vargas, I. y cols. (2007). Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology*; 7: 9-22.

- Salzburger, W., Ewing, G.B. y Haeseler, A.V. (2011). The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology*, 20: 1952-1963.
- Samanidou-Voyadjoglou, A., Patsoula, E., Spanakos, G. y cols. (2005). Confirmation of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Greece. *European Mosquito Bulletin*; 19: 10-12.
- Santana, A.L., Roque, R.A. y Eiras, A.E. (2006). Characteristics of grass infusions as oviposition attractants to *Aedes* (Stegomyia) (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*; 43: 214-220.
- Santos, A.H., Tai, M.H.H., Rocha, L.F.N. y cols. (2009). Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *Aedes aegypti*. *Biological Control*; 50: 37-42.
- Savage, H.M., Ezike, V.I., Nwankwo, A.C. y cols. (1992). First record of breeding populations of *Aedes albopictus* in continental Africa: implications for arboviral transmission. *Journal of the American Control Association*; 8(1): 101-103.
- Schaffner, F. y Karch, S. (2000). First report of *Aedes albopictus* (Skuse, 1984) in metropolitan France. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III*; 323(4):373-375.
- Schaffner, F., Angel, G., Geoffroy, B. y cols. (2001). The mosquitoes of Europe/Les moustiques d'Europe (programa de ordenador). Montpellier, France: IRD Éditions and EID Méditerranée.
- Schaffner, F., Medlock, J.M. y Van Bortel, W. (2013). Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*; 19(8): 685-692.
- Schmidt-Chanasit, J., Haditsch, M., Schoneberg, I. y cols. (2010). Dengue virus infection in a traveller returning from Croatia to Germany. *Eurosurveillance*; 15: 19677.
- Scholte, E.J. y Schaffner F. (2007). Waiting for the tiger: establishment and spread of the *Aedes albopictus* mosquito in Europe. 241-260 En: Emerging pests and vector-borne diseases in Europe. Vol. 1. Ed: Takken W., Knols B. G. J. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Scholte, E.J., Knols, B.G.J., Samson, R. y cols. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal of Insect Science*; 4: 19.
- Scholte, E.J., Njiru, B.N., Smallegange, R.C. y cols (2003). Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal*; 2: 29.
- Scholte, E.J., Takken, W. y Knols, B.G.J. (2007). Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*; 102: 151-158.
- Schottenhammer, A. (2012). The "China Seas" in world history: A general outline of the role of Chinese and East Asian maritime space from its origins to c. 1800. *Journal of Marine and Island Cultures*; 1: 63-86.
- Scott, T.W. y Morrison, A.C. (2003). *Aedes aegypti* density and the risk of dengue virus transmission. 187-206. En: Ecological aspects for application of genetically modified mosquitoes. Eds: Takken W, Scott TW. Dordrecht (the Netherlands): Kluwer Academic Publishers.

- Scott, T.W. y Takken, W. (2012). Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. *Trends Parasitology*; 28: 114-121.
- Semenza, J.C., Sudre, B., Miniota, J. y cols. (2014). International dispersal of dengue through air travel: importation risk for Europe. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8(12): e3278.
- Shaikevich, E. y Talbalaghi, A. (2013). Molecular characterization of the Asian Tiger mosquito *Ae. albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Northern Italy. *ISRN Entomology*; 2013: 6.
- Shajahan, J., Kyei-Poku, G., Gauthier, D. y cols. (2012). Characterization and virulence of *Beauveria* spp. recovered from emerald ash borer in southwestern Ontario, Canada. *Journal of Invertebrate Pathology*; 111(1):41-49.
- Shepard, D.S., Halasa, Y.A., Fonseca, D.M. y cols. (2014). Economic evaluation of an area-wide integrated Pest Management program to control the Asian tiger mosquito in New Jersey. *PloS One*; 9(10): e111014
- Sherpa, S., Rioux, D., Pougnet-Lagarde, C. y cols. (2018). Genetic diversity and distribution differ between long-established and recently introduced populations in the invasive mosquito *Ae. albopictus*. *Infection, Genetics and Evolution*; 58: 145-156.
- Shragai, T., Tesla, B., Murdock, C. y cols. (2017). Zika and chikungunya: mosquito-borne viruses in a changing world. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1399, 61-77.
- Skuse, F.A.A. (1894). The banded mosquito of Bengal. *Indian Museum Notes*; 3(5): 20.
- Snetselaar, J., Andriessen, R., Suer, R.A. y cols. (2014). Development and evaluation of a novel contamination device that targets multiple life-stages of *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*; 7(1):200.
- Song, J., Shi, L., Li, D. y cols. (2012). Extensive pyrosequencing reveals frequent intra-genomic variations of Internal Transcribed Spacer Regions of nuclear ribosomal DNA. *Plos One*; 7: e43971.
- Soumare, M.K.F. y Cilek, J.E. (2011). The effectiveness of *Mesocyclops longisetus* (Copepoda) for the control of container-inhabiting mosquitoes in residential environments. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 27:376-383.
- Spielman, A.(1964). The mechanics of copulation in *Aedes aegypti*. *Biological Bulletin*; 127 (10): 324-344.
- Sprenger, D. y Wuithiranyagool, T. (1986). The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 2: 217-219.
- Succo, T., Leparç-Goffart, I., Ferré, J. y cols. (2016). Autochthonous dengue outbreak in Nimes, South of France, July to September 2015. *Eurosurveillance*; 21: 1-7.
- Suman, D.S., Wang, Y. y Gaugler, R. (2015). The Insect Growth Regulator Pyriproxyfen terminates egg diapause in the Asian tiger mosquito, *Ae. albopictus*. *PloS One*; 10(6): e0130499.
- Suman, D.S., Wang, Y., Bilgrami, A.L. y cols. (2013). Ovicidal activity of three insect growth regulators against *Aedes* and *Culex* mosquitoes. *Acta Tropica*; 128:103-109.
- Sung, G.H., Hywel-Jones, N.L., Sung, J.M. y cols. (2007). Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*; 57: 5-59.

- Tadano, T. (1984). Linkage studies on a-glycerophosphate and isocitrate deshydrogenase in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Biochemical. Genetics*; 22: 589-595.
- Tadano, T. (1987). Genetic studies on two carboxylesterase loci in *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 3:137-141.
- Takken, W. y Knols, B.G.J. (2007). Emerging pests and vector-borne diseases in Europe. Editores: Takken W y Knols BGJ. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Takken, W., Costantini, C., Dolo, G. y cols. (2006). Mosquito mating behaviour. 183-188. En: *Bridging Laboratory and Field Research for Genetic Control of Disease Vectors*. Eds: Kitsos, L., Knols, B. Dordrecht: Kluwer. Academic Press.
- Talavera, S., Aranda, C., Birnberg, L. y cols., (2017). Detection of Wolbachia sp. From field mosquitoes *Ae. albopictus* and *Culex pipiens* from Northeast Spain. Poster 108. Book of abstracts p245. 7th International SOVE (Society of Vector Ecology) congress. Palma de Mallorca, 1-7 Octubre 2017.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D. y cols. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*; 30: 2725-2729.
- Tesh, R.B. (1980). Infectivity and pathogenicity of Nodamura virus for mosquitoes. *Journal of General Virology*; 48(1): 177-182.
- Thomas, M.B. y Read, A.F. (2007). Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews Microbiology*; 5:377-383.
- Thomas, S.M., Obermayr, U., Fischer, D. y cols. (2012). Low-temperature threshold for egg survival of a post-diapause and non-diapause European Aedine strain, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*; 5: 1-7.
- Throne, J.E., Weaver, D.K., Chew, V. y cols. (1995). Probit analysis of correlated data: multiple observations over time at one concentration. *Biostatistics. Journal of Economic Entomology*; 88(5): 1510-1512.
- Toma, L., Severini, F., Di Luca, M. y cols. (2003). Seasonal patterns of oviposition and egg hatching rate of *Aedes albopictus* in Rome. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 19(1): 19-22.
- Toto, J.C., Abaga, S., Carnevale, P. y cols. (2003). First report of the oriental mosquito *Aedes albopictus* on the West African island of Bioko, Equatorial Guinea. *Medical and Veterinary Entomology*; 17(3): 343-346.
- TRAGSA. (2017). En: <http://www.tragsa.es/es/comunicacion/noticias/Paginas/17-segunda-reuni%C3%B3n-internacional-para-control-de-mosquitos.aspx>
- Traver, B.E., Anderson, M.A.E. y Adelman, Z.N. (2009). Homing endonucleases catalyze double-stranded DNA breaks and somatic transgene excision in *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*; 18: 623-633.
- Trexler, J.D., Apperson, C.S., Gemeno, C. y cols. (2003). Field and laboratory evaluations of potential oviposition attractants for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*; 19: 228-234.
- Tu, Y. (2011). The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature Medicine*; 17: 1217-1220.

- Uma devi, K., Reineke, A., Nageswara Rao Reddy, N. y cols. (2006). Genetic diversity, reproductive biology, and speciation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Genome*; 49: 495-504.
- Unlu, I., Farajollahi, A., Healy, S.P. y cols. (2011). Area-wide management of *Ae. albopictus*: Choice of study sites based on geospatial characteristics, socioeconomic factors and mosquito populations. *Pest Management Science*; 67(8): 965-974.
- Unlu, I., Klingler, K., Indelicato, N. y cols. (2016). Suppression of *Ae. albopictus*, the Asian tiger mosquito, using a “hot spot” approach. *Pest Management Science*; 72(7): 1427-1432.
- Unlu, I., Suman, D.S., Wang, Y. (2017). Effectiveness of autodissemination stations containing pyriproxyfen in reducing immature *Ae. albopictus* populations. *Parasites & Vectors*; 10(1): 139.
- Urbanelli, S., Bellini, R., Carrieri, M. y cols. (2000). Population structure of *Ae. albopictus* (Skuse): the mosquito which is colonizing Mediterranean countries. *Heredity*; 84: 331-337.
- Urbanski, J.M., Benoit, J.B., Michaud, M.R. y cols. (2010). The molecular physiology of increased egg desiccation resistance during diapause in the invasive mosquito, *Ae. albopictus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*; 277: 2683-2692.
- Valerio, L., Marini, F., Bongiorno, G. y cols. (2010). Host-feeding patterns of *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) in urban and rural contexts within Rome province, Italy. *Vector Borne Zoonotic Diseases*; 10(3): 291-294.
- Vallorani, R., Angelini, P., Bellini, R. y cols. (2015). Temperature characterization of different urban microhabitats of *Aedes albopictus* (Diptera Culicidae) in Central-Northern Italy. *Environmental Entomology*; 44: 1182-1192.
- Van den Hurk, A.F., Hall-Mendelin, S., Pyke, A.T. y cols. (2012). Impact of *Wolbachia* on infection with chikungunya and yellow fever viruses in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *Plos Neglected Tropical Diseases*; 6(11):e1892.
- Vega, F.E., Meyling, N.V., Luangsa-Ard, J.J. y cols. (2012). Fungal entomopathogens Second Edi. Insect Pathology. Elsevier Inc.
- Vega-Rua, A., Lourenco-de-Oliveira, R., Mousson, L. y cols. (2015). Chikungunya virus transmission potential by local *Aedes* mosquitoes in the Americas and Europe. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 9(5):e0003780.
- Venturi, G., Di Luca, M., Fortuna, C. y cols. (2017). Detection of a chikungunya outbreak in Central Italy. *Eurosurveillance*; 22: 1-4.
- Veronesi, R., Carrieri, M., Maccagnani, B. y cols. (2015). *Macrocyclus albidus* (Copepoda: Cyclopidae) for the biocontrol of *Ae. albopictus* and *Culex pipiens* in Italy. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 31(1): 32-43.
- Vilcinskas, A. y Götz, P. (1999). Parasitic Fungi and their interactions with the insect immune system. *Advances in Parasitology*; 43:267-313.
- Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, N. y cols. (2012). Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*; 104:126-131.
- Vreysen, M.J.B., Saleh, K., Mramba, F. y cols. (2014). Sterile Insects to enhance agricultural development: The case of sustainable Tsetse eradication on Unguja Island, Zanzibar,

- using an area-wide integrated Pest Management Approach. *PLOS Neglected Tropical Diseases*; 8: 1-5.
- Waddell, D. (1990). Yellow fever in Europe in the early 19th century – Cádiz 1819. Report of Preceedings. *Scottish Society of History of Medicine*; 1990-1992: 20-34.
- Waldock, J., Chandra, N.L., Lelieveld, J. y cols. (2013). The role of environmental variables on *Ae. albopictus* biology and chikungunya epidemiology. *Pathogens and Global Health*; 107:224-241.
- Walter, H. (1997). Zonas de Vegetación y clima. 2ª reimpresión. Omega, Barcelona, traducida por Margarida Costa de *Vegetationszonen und Klima* (1977), Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Walther, D., Scheuch, D.E. y Kampen, H. (2017). The invasive Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Germany: Local reproduction and overwintering. *Acta Tropica*; 166: 186-192.
- Waltz, E. (2017). US government approves 'killer' mosquitoes to fight disease. *Nature News*. Springer Nature.
- Werner, D., Kronefeld, M., Schaffner, F. y cols. (2012). Two invasive mosquito species, *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus japonicus*, trapped in south-west Germany, July to August 2011. *Eurosurveillance*; 17:020067
- Werren, J. (1997). Biology of Wolbachia. *Annual Review of Entomology*; 42: 587-609.
- White, M.K., Wollebo, H.S., Beckham, J.D. y cols. (2016). Zika Virus: An emergent neuropathological agent. *Annals of Neurology*; 80(4):479-489.
- WHO (World Health Organization) and the Special Programme for Research and Tropical Diseases (TDR). (2009). Dengue Guidelines for diagnosis, tretment, prevention and control. Prevention and Control. World Health Organization. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23762963>
- WHO (World Health Organization). (1997). Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control (2nd ed.). Geneva: World Health Organization.
- WHO (World Health Organization). (2006). Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public healthimportance. World Health Organization (6th ed.). Geneva: World Health Organization
- Wilkerson, R.C., Linton, Y.M., Fonseca, D.M. y cols. (2015). Making mosquito taxonomy useful: A stable classification of tribe Aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships. *PLoS One*; 10: 1-26.
- Windbichler, N., Menichelli, M., Papathanos, P.A. y cols. (2011). A synthetic homing endonuclease-based gene drive system in the human malaria mosquito. *Nature*; 473:212-217.
- Wong, P.S., Li, M.Z., Chong, C.S. y cols. (2013). *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 7(8):e2348.
- Worobey, J., Fonseca, D.M., Espinosa, C. y cols. (2013). Child outdoor physical activity is reduced by prevalence of the Asian Tiger Mosquito, *Ae. albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 29(1): 78-80.
- Wymann, M.N., Flacio, E., Radczuweit, S. y cols. (2008). Asian tiger mosquito – a threat for Switzerland? *Eurosurveillance*; 13(10): 8058.

- Xu, J., Bonizzoni, M., Zhong, D. y cols. (2016). Multi-country survey revealed prevalent and novel F1534S mutation in Voltage-Gated Sodium Channel (VGSC) gene in *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 10(5): e00046961-12.
- Yee, D., Juliano, S. y Vamosi, S.M. (2012). Seasonal photoperiods alter developmental time and mass of an invasive mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), across its north-south range in the United States. *Journal of medical entomology*; 49: 825-832.
- Yergolkar, P.N., Tandale, B.V., Arankalle, V.A. y cols. (2006). Chikungunya outbreaks caused by African genotype, India. *Emerging infectious diseases journal*; 12: 1580-1583.
- Yong, H.S., Dhaliwal, S.S., Cheong, W.H. y cols. (1982). Multiple glucose phosphate isomerase alleles in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from peninsular Malaysia. *Comparative biochemistry and physiology*; 73(2):265-267.
- Zawani, M.K.N., Abu, H.A., Sazaly, A.B. y cols (2014). Population genetic structure of *Ae. albopictus* in Penang , Malaysia. *Genetics and Molecular Research*; 13(4): 8184-8196.
- Zeichner, B.C. y Debboun, M. (2011). The lethal ovitrap: a response to the resurgence of dengue and chikungunya. *U.S. Army Medical Department Journal*; 4-11.
- Zhang, D., Lees, R.S., Xi, Z. y cols. (2015). Combining the sterile insect technique with wolbachia-based approaches: II. A safer approach to *Aedes albopictus* population suppression programmes, designed to minimize the consequences of inadvertent female release. *PLoS ONE*; 10(8): e0135194.
- Zhang, Xia, Y.X., Kim, B. y cols. (2011). Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Molecular Microbiology*; 80(3): 811-826.
- Zhong, D., Lo, E., Hu, R. y cols. (2013). Genetic analysis of invasive *Ae. albopictus* populations in Los Angeles county , California and its potential public health impact. *PLoS ONE*; 8(7): e68586.
- Zouache, K., Fontaine, A., Vega-Rua, A. y cols. (2014). Three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*; 281(1792): 20141078.
- Zuharah, W.F., Fadzly, N., Wei, W. y cols. (2016). Oviposition habitat selection of dengue vectors, *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* in response to fish predator. *Tropical Life Sciences Research*; 27(1): 117-122.

ANEXOS

Tabla 1. Resultados completos de la vigilancia entomológica de *Ae. albopictus* en el periodo 2011-2016.

AÑO	CCAA	Provincia	Municipio	Puntos	Ovitrap	Fecha inicio	Fecha fin	Tablillas	Puntos POS	Tab POS	Primer
2011	Com. Valenciana	Alicante	Guardamar del Segura	6	35	27/08/2011	21/09/2011	104	5	37	1
2011	Com. Valenciana	Alicante	Orihuela	10	50	27/08/2011	21/09/2011	185	9	48	
2011	Com. Valenciana	Alicante	Pilar de la Horadada	4	15	27/08/2011	21/09/2011	53	1	6	1
2011	Com. Valenciana	Alicante	Torreveija	9	70	27/08/2011	21/09/2011	240	8	66	
2011	Com. Valenciana	Castellón	Benicasim	10	35	14/09/2011	18/11/2011	126	8	17	
2011	Com. Valenciana	Castellón	Castellón de la Plana	4	40	14/09/2011	18/11/2011	120	0	0	
2011	Com. Valenciana	Castellón	Oropesa	5	35	14/09/2011	18/11/2011	130	3	24	1
2011	Islas Baleares	Mallorca	Palma de Mallorca	2	16	12/08/2011	12/12/2011	64	0	0	
2011	Región de Murcia	Murcia	Murcia	1	0	21/09/2011	15/10/2011	--	1	--	1
2011	Región de Murcia	Murcia	San Pedro del Pinatar	3	15	27/08/2011	21/09/2011	51	0	0	
2012	Com. Valenciana	Alicante	Benijofar	3	15	02/09/2012	23/10/2012	42	3	9	1
2012	Com. Valenciana	Alicante	Elche	3	25	02/09/2012	23/10/2012	63	1	2	1
2012	Com. Valenciana	Alicante	Guardamar del Segura	5	20	02/09/2012	23/10/2012	68	5	28	
2012	Com. Valenciana	Alicante	Los Montesinos	1	5	02/09/2012	23/10/2012	14	0	0	
2012	Com. Valenciana	Alicante	Orihuela	4	20	02/09/2012	23/10/2012	61	4	13	
2012	Com. Valenciana	Alicante	Pilar de la Horadada	2	10	02/09/2012	23/10/2012	31	2	16	
2012	Com. Valenciana	Alicante	Rojales	4	15	02/09/2012	23/10/2012	36	4	9	1
2012	Com. Valenciana	Alicante	San Miguel de Salinas	3	15	02/09/2012	23/10/2012	29	0	0	
2012	Com. Valenciana	Alicante	Santa Pola	4	15	02/09/2012	23/10/2012	34	2	3	1
2012	Com. Valenciana	Alicante	Torreveija	6	30	02/09/2012	23/10/2012	78	4	20	
2012	Com. Valenciana	Castellón	Alcalá de xivert	3	15	02/09/2012	23/10/2012	60	0	0	
2012	Com. Valenciana	Castellón	Almassora	3	15	02/09/2012	23/10/2012	15	0	0	
2012	Com. Valenciana	Castellón	Almenara	6	30	02/09/2012	23/10/2012	103	0	0	
2012	Com. Valenciana	Castellón	Benicasim	3	15	02/09/2012	23/10/2012	112	1	4	
2012	Com. Valenciana	Castellón	Borriol	2	15	02/09/2012	23/10/2012	55	2	3	1
2012	Com. Valenciana	Castellón	Cabanes	3	15	02/09/2012	23/10/2012	56	0	0	
2012	Com. Valenciana	Castellón	Castellón de la Plana	2	30	02/09/2012	23/10/2012	156	2	23	1
2012	Com. Valenciana	Castellón	La Pobla Tornesa	3	15	02/09/2012	23/10/2012	45	1	5	1
2012	Com. Valenciana	Castellón	Oropesa	3	30	02/09/2012	23/10/2012	118	1	3	
2012	Com. Valenciana	Castellón	Torreblanca	2	45	02/09/2012	23/10/2012	180	2	2	1
2012	Com. Valenciana	Castellón	Vall d'Alba	3	15	02/09/2012	23/10/2012	43	1	1	1
2012	Com. Valenciana	Castellón	Vilafamés	2	15	02/09/2012	23/10/2012	38	0	0	
2012	Com. Valenciana	Valencia	Bétera	2	24	02/09/2012	23/10/2012	96	0	0	
2012	Com. Valenciana	Valencia	Canet d'en Berenguer	1	24	02/09/2012	23/10/2012	88	0	0	
2012	Com. Valenciana	Valencia	Cullera	3	16	02/09/2012	23/10/2012	58	0	0	
2012	Com. Valenciana	Valencia	L'Elia	4	24	02/09/2012	23/10/2012	96	0	0	
2012	Com. Valenciana	Valencia	Manises	2	18	02/09/2012	23/10/2012	57	0	0	
2012	Com. Valenciana	Valencia	Paterna	2	24	02/09/2012	23/10/2012	94	0	0	
2012	Com. Valenciana	Valencia	Sagunto	2	48	02/09/2012	23/10/2012	157	0	0	
2012	Com. Valenciana	Valencia	Sueca	2	32	02/09/2012	23/10/2012	116	0	0	
2012	Com. Valenciana	Valencia	Tavernes de la Valldigna	2	16	02/09/2012	23/10/2012	62	0	0	
2012	Com. Valenciana	Valencia	Valencia	3	64	02/09/2012	23/10/2012	249	0	0	
2012	Islas Baleares	Mallorca	Búger	5	5	27/08/2012	15/10/2012	14	0	0	
2012	Islas Baleares	Mallorca	Bunyola	60	60	27/08/2012	15/10/2012	268	57		1
2012	Islas Baleares	Mallorca	Calvià	13	13	27/08/2012	15/10/2012	47	1		1
2012	Islas Baleares	Mallorca	Esporles	15	15	27/08/2012	15/10/2012	49	3		1
2012	Islas Baleares	Mallorca	Marratxí	35	35	27/08/2012	15/10/2012	122	6		1
2012	Islas Baleares	Mallorca	Palma	74	74	27/08/2012	15/10/2012	210	3		1
2012	Región de Murcia	Murcia	Murcia	34	34	03/10/2012	19/11/2012	100	14	19	
2012	Región de Murcia	Murcia	San Pedro del Pinatar	CTL	10	02/09/2012	23/10/2012	29	1	2	1
2013	Com. Valenciana	Alicante	Albatera	2	10	18/09/2013	30/10/2013	13	0	0	
2013	Com. Valenciana	Alicante	Algorfa	1	5	18/09/2013	30/10/2013	10	1	1	1
2013	Com. Valenciana	Alicante	Alicante	4	20	18/09/2013	30/10/2013	37	2	12	1
2013	Com. Valenciana	Alicante	Benejúzar	1	5	18/09/2013	30/10/2013	7	1	1	1
2013	Com. Valenciana	Alicante	Benijófar	3	15	18/09/2013	30/10/2013	38	3	26	

2013	Com. Valenciana	Alicante	Bigastro	2	10	18/09/2013	30/10/2013	18	0	0	
2013	Com. Valenciana	Alicante	Catral	2	10	18/09/2013	30/10/2013	14	0	0	
2013	Com. Valenciana	Alicante	Crevillente	4	20	18/09/2013	30/10/2013	20	0	0	
2013	Com. Valenciana	Alicante	Daya Nueva	2	10	18/09/2013	30/10/2013	21	2	4	1
2013	Com. Valenciana	Alicante	Daya Vieja	1	5	18/09/2013	30/10/2013	9	1	2	1
2013	Com. Valenciana	Alicante	Dolores	2	10	19/09/2013	30/10/2013	14	1	3	1
2013	Com. Valenciana	Alicante	Elche	4	25	18/09/2013	30/10/2013	55	1	2	1
2013	Com. Valenciana	Alicante	Formentera del Segura	2	10	18/09/2013	30/10/2013	30	1	3	1
2013	Com. Valenciana	Alicante	Guardamar del Segura	5	20	18/09/2013	30/10/2013	46	5	11	
2013	Com. Valenciana	Alicante	Jacarilla	1	5	18/09/2013	30/10/2013	8	1	1	1
2013	Com. Valenciana	Alicante	Los Montesinos	1	5	19/09/2013	30/10/2013	14	1	1	1
2013	Com. Valenciana	Alicante	Orihuela	5	25	18/09/2013	30/10/2013	55	3	18	
2013	Com. Valenciana	Alicante	Pilar de la Horadada	2	10	19/09/2013	30/10/2013	26	2	8	
2013	Com. Valenciana	Alicante	Rojales	4	15	19/09/2013	30/10/2013	26	2	11	
2013	Com. Valenciana	Alicante	San Fulgencio	2	10	19/09/2013	30/10/2013	16	2	4	1
2013	Com. Valenciana	Alicante	San Isidro	2	10	19/09/2013	30/10/2013	14	0	0	
2013	Com. Valenciana	Alicante	San Miguel de Salinas	3	15	19/09/2013	30/10/2013	27	0	0	
2013	Com. Valenciana	Alicante	Santa Pola	6	15	19/09/2013	30/10/2013	29	1	2	
2013	Com. Valenciana	Alicante	Torrevieja	4	20	19/09/2013	30/10/2013	41	4	24	
2013	Com. Valenciana	Castellón	Alcalá de xivert	3	15	19/09/2013	04/11/2013	28	3	6	1
2013	Com. Valenciana	Castellón	Alcora	3	15	19/09/2013	04/11/2013	33	3	17	1
2013	Com. Valenciana	Castellón	Almassora	3	15	19/09/2013	04/11/2013	33	3	14	1
2013	Com. Valenciana	Castellón	Benicarló	3	15	27/09/2013	19/11/2013	36	2	15	1
2013	Com. Valenciana	Castellón	Benicassim	3	15	19/09/2013	04/11/2013	42	3	16	
2013	Com. Valenciana	Castellón	Benlloch	3	15	19/09/2013	04/11/2013	28	3	5	1
2013	Com. Valenciana	Castellón	Borriol	2	15	19/09/2013	04/11/2013	24	2	17	
2013	Com. Valenciana	Castellón	Burriana	3	15	19/09/2013	04/11/2013	30	2	3	1
2013	Com. Valenciana	Castellón	Cabanes	3	15	19/09/2013	04/11/2013	32	3	10	1
2013	Com. Valenciana	Castellón	Castellón de la Plana	2	10	19/09/2013	04/11/2013	26	2	24	
2013	Com. Valenciana	Castellón	Cuevas de Vinroma	3	15	19/09/2013	04/11/2013	26	2	2	1
2013	Com. Valenciana	Castellón	La Pobla Tornesa	2	10	19/09/2013	04/11/2013	23	2	20	
2013	Com. Valenciana	Castellón	Oropesa del Mar	2	10	19/09/2013	04/11/2013	25	2	14	
2013	Com. Valenciana	Castellón	Peñíscola	5	25	27/09/2013	19/11/2013	71	5	23	1
2013	Com. Valenciana	Castellón	San Juan de Moro	2	8	19/09/2013	04/11/2013	18	2	8	1
2013	Com. Valenciana	Castellón	Sierra Engarcerán	2	10	19/09/2013	04/11/2013	20	1	2	1
2013	Com. Valenciana	Castellón	Torre Endomelech	2	8	19/09/2013	04/11/2013	11	0	0	
2013	Com. Valenciana	Castellón	Torreblanca	3	15	19/09/2013	04/11/2013	37	3	11	
2013	Com. Valenciana	Castellón	Vall d'Alba	2	10	19/09/2013	04/11/2013	23	0	0	
2013	Com. Valenciana	Castellón	Vila Real	3	15	19/09/2013	04/11/2013	23	3	12	1
2013	Com. Valenciana	Castellón	Vilafamés	3	15	19/09/2013	04/11/2013	39	3	14	1
2013	Com. Valenciana	Castellón	Villanueva de Alcolea	3	15	19/09/2013	04/11/2013	33	3	16	1
2013	Com. Valenciana	Castellón	Vinarós	3	15	27/09/2013	19/11/2013	42	2	13	1
2013	Com. Valenciana	Valencia	Alacuás	3	15	18/09/2013	04/11/2013	34	0	0	
2013	Com. Valenciana	Valencia	Alcira	2	10	23/09/2013	28/10/2013	32	0	0	
2013	Com. Valenciana	Valencia	Canet d'en Berenguer	3	15	27/09/2013	19/11/2013	33	0	0	
2013	Com. Valenciana	Valencia	Cullera	3	20	17/09/2013	22/11/2013	75	3	22	1
2013	Com. Valenciana	Valencia	Gandía	7	25	17/09/2013	22/11/2013	91	3	7	1
2013	Com. Valenciana	Valencia	L'Elia	3	15			42	0	0	
2013	Com. Valenciana	Valencia	Manises	3	15	29/07/2013	27/11/2013	38	0	0	
2013	Com. Valenciana	Valencia	Oliva	3	15	08/11/2013	21/11/2013	15	0	0	
2013	Com. Valenciana	Valencia	Paiporta	3	15	18/09/2013	04/11/2013	45	0	0	
2013	Com. Valenciana	Valencia	Sagunto	3	15	27/09/2013	19/11/2013	41	0	0	
2013	Com. Valenciana	Valencia	Sueca	4	20	17/09/2013	22/11/2013	76	2	3	1
2013	Com. Valenciana	Valencia	Tavernes de la Valldigna	3	15	08/11/2013	21/11/2013	13	0	0	
2013	Com. Valenciana	Valencia	Torrente	3	15	18/09/2013	04/11/2013	33	0	0	
2013	Com. Valenciana	Valencia	Valencia	8	35	08/11/2013	21/11/2013	39	0	0	
2013	Com. Valenciana	Valencia	Xeraco	2	15	08/11/2013	21/11/2013	15	0	0	
2013	Islas Baleares	Mallorca	Palma de Mallorca	2	40	13/08/2013	15/11/2013	199	1	1	
2013	País Vasco	Álava	San Millán/Donemiliaga	1	10	29/08/2013	13/11/2013	118	0	0	

2013	País Vasco	Guipúzcoa	Donosti	1	10	04/09/2013	13/11/2013	110	0	0	
2013	País Vasco	Guipúzcoa	Hernani	1	8	17/09/2013	13/11/2013	72	0	0	
2013	País Vasco	Guipúzcoa	Irún	1	10	04/09/2013	13/11/2013	110	0	0	
2013	Región de Murcia	Murcia	Águilas	37	37	15/10/2013	19/12/2013	72	4	4	1
2013	Región de Murcia	Murcia	Beniel	3	3	30/09/2013	15/11/2013	12	0	0	
2013	Región de Murcia	Murcia	Cartagena	107	107	16/10/2013	18/12/2013	201	30	38	1
2013	Región de Murcia	Murcia	La Unión	8	8	17/10/2013	18/12/2013	14	0	0	
2013	Región de Murcia	Murcia	Lorca	4	4	15/10/2013	19/11/2013	8	0	0	
2013	Región de Murcia	Murcia	Los Alcázares	18	18	21/10/2013	21/11/2013	31	0	0	
2013	Región de Murcia	Murcia	Mazarrón	25	25	15/10/2013	19/12/2013	47	11	13	
2013	Región de Murcia	Murcia	Molina del Segura	2	2	30/09/2013	15/11/2013	8	0	0	
2013	Región de Murcia	Murcia	Murcia	43	42	30/09/2013	15/11/2013	164	34	34	
2013	Región de Murcia	Murcia	San Javier	33	21	17/09/2013	21/11/2013	79	2	2	1
2013	Región de Murcia	Murcia	San Pedro del Pinatar	27	19	19/09/2013	21/11/2013	60	2	5	
2013	Región de Murcia	Murcia	Santomera	1	1	30/09/2013	15/11/2013	4	0	0	
2013	Región de Murcia	Murcia	Torrepacheco	21	9	17/09/2013	30/10/2013	32	0	0	
2014	Andalucía	Almería	Adra	2	6	08/09/2014	28/10/2014	17	0	0	
2014	Andalucía	Almería	Almería	5	15	07/09/2014	27/10/2014	40	0	0	
2014	Andalucía	Almería	Carboneras	1	3	07/09/2014	27/10/2014	3	0	0	
2014	Andalucía	Almería	Cuevas del Almanzora	9	18	17/09/2014	27/11/2014	83	0	0	
2014	Andalucía	Almería	El Ejido	4	12	07/09/2014	27/10/2014	32	0	0	
2014	Andalucía	Almería	Garrucha	4	8	17/09/2014	27/11/2014	39	1	1	1
2014	Andalucía	Almería	Níjar	3	9	07/09/2014	27/10/2014	27	0	0	
2014	Andalucía	Almería	Pulpí	8	16	17/09/2014	27/11/2014	72	3	5	1
2014	Andalucía	Almería	Vera	8	16	17/09/2014	27/11/2014	72	0	0	
2014	Andalucía	Granada	Albuñol	1	3	08/09/2014	28/10/2014	9	0	0	
2014	Andalucía	Granada	Gualchos	2	6	08/09/2014	28/10/2014	18	2	4	1
2014	Andalucía	Granada	Motril	7	21	08/09/2014	28/10/2014	55	0	0	
2014	Andalucía	Granada	Polopos	2	6	08/09/2014	28/10/2014	18	2	2	1
2014	Andalucía	Málaga	Alhaurín de la Torre	11	10	30/07/2014	08/08/2014	9	4	4	1
2014	Castilla La Mancha	Albacete	Socovos	10	10	13/06/2014	15/10/2014	88	0	0	
2014	Com. Valenciana	Alicante	Altea	4	12	04/09/2014	30/10/2014	19	4	14	1
2014	Com. Valenciana	Alicante	Benidorm	4	12	04/09/2014	30/10/2014	20	4	16	1
2014	Com. Valenciana	Alicante	Calpe	4	12	04/09/2014	30/10/2014	22	4	18	1
2014	Com. Valenciana	Alicante	Denia	4	12	04/09/2014	30/10/2014	21	3	11	1
2014	Com. Valenciana	Alicante	El Campello	3	12	04/09/2014	30/10/2014	44	3	32	
2014	Com. Valenciana	Alicante	Jávea	4	12	04/09/2014	30/10/2014	22	4	18	1
2014	Com. Valenciana	Alicante	Ondara	3	9	04/09/2014	30/10/2014	11	1	7	1
2014	Com. Valenciana	Alicante	San Juan de Alicante	6	17	04/09/2014	30/10/2014	63	6	37	1
2014	Com. Valenciana	Alicante	Teulada	3	9	04/09/2014	30/10/2014	15	3	14	1
2014	Com. Valenciana	Alicante	Villajoyosa	3	12	04/09/2014	30/10/2014	20	2	10	1
2014	Com. Valenciana	Castellón	Almenara	2	6	04/09/2014	21/11/2014	24	0	0	
2014	Com. Valenciana	Castellón	Chilches	2	6	04/09/2014	21/11/2014	24	0	0	
2014	Com. Valenciana	Castellón	La Llosa	1	3	04/09/2014	21/11/2014	11	0	0	
2014	Com. Valenciana	Castellón	Moncofar	3	9	04/09/2014	21/11/2014	34	0	0	
2014	Com. Valenciana	Castellón	Nules	2	9	04/09/2014	21/11/2014	32	1	1	1
2014	Com. Valenciana	Valencia	Alboraya	2	6	05/09/2014	24/11/2014	33	0	0	
2014	Com. Valenciana	Valencia	Alzira	4	12	03/09/2014	18/11/2014	19	3	4	1
2014	Com. Valenciana	Valencia	Canet de Berenguer	1	0	21/10/2014	--	0	1	0	1
2014	Com. Valenciana	Valencia	El Puig	2	6	05/09/2014	24/11/2014	21	0	0	
2014	Com. Valenciana	Valencia	Godella	1	0	25/09/2014	--	0	1	0	1
2014	Com. Valenciana	Valencia	L'Elia	2	6	01/09/2014	30/10/2014	24	0	0	
2014	Com. Valenciana	Valencia	La Pobla de Farnals	2	6	05/09/2014	24/11/2014	24	1	1	1
2014	Com. Valenciana	Valencia	La Pobla de Vallbona	1	3	01/09/2014	30/10/2014	12	0	0	
2014	Com. Valenciana	Valencia	Manises	3	15	12/06/2014	24/11/2014	135	0	0	
2014	Com. Valenciana	Valencia	Massalfassar	3	9	05/09/2014	24/11/2014	36	0	0	
2014	Com. Valenciana	Valencia	Oliva	4	12	04/09/2014	30/10/2014	17	3	5	1
2014	Com. Valenciana	Valencia	Paiporta	2	0	25/09/2014	--	0	2	0	1
2014	Com. Valenciana	Valencia	Puzol	4	12	05/09/2014	24/11/2014	44	0	0	

2014	Com. Valenciana	Valencia	Real de Gandía	1	3	03/09/2014	18/11/2014	6	1	6	
2014	Com. Valenciana	Valencia	Sagunto	6	18	05/09/2014	24/11/2014	70	1	3	1
2014	Com. Valenciana	Valencia	Tavernes de la Valldigna	4	12	03/09/2014	18/11/2014	20	1	1	1
2014	Com. Valenciana	Valencia	Torrente	1	3	01/09/2014	30/10/2014	12	0	0	
2014	Com. Valenciana	Valencia	Valencia	4	20	12/06/2014	24/11/2014	180	3	0	
2014	Islas Baleares	Mallorca	Algaida	7	7	27/05/2014	03/12/2014	84	1	1	1
2014	Islas Baleares	Mallorca	Andratx	19	19	19/05/2014	15/11/2014	228	2	13	1
2014	Islas Baleares	Mallorca	Banyalbufar	5	5	27/05/2014	03/12/2014	58	2	18	1
2014	Islas Baleares	Mallorca	Bunyola	19	19	27/05/2014	03/12/2014	82	7	56	
2014	Islas Baleares	Mallorca	Calvià	58	58	27/05/2014	03/12/2014	676	21	57	
2014	Islas Baleares	Mallorca	Consell	5	5	27/05/2014	03/12/2014	10	0	0	
2014	Islas Baleares	Mallorca	Deià	6	6	27/05/2015	03/12/2014	72	0	2	
2014	Islas Baleares	Mallorca	Esporles	19	19	27/05/2015	03/12/2014	73	8	42	
2014	Islas Baleares	Mallorca	Estellencs	2	2	27/05/2015	03/12/2014	4	0	0	
2014	Islas Baleares	Mallorca	Llucmajor	49	49	27/05/2015	03/12/2014	455	7	12	1
2014	Islas Baleares	Mallorca	Marratxí	34	34	27/05/2015	03/12/2014	372	25	104	
2014	Islas Baleares	Mallorca	Palma de Mallorca	2	31	27/05/2015	03/12/2014	245	1	13	
2014	Islas Baleares	Mallorca	Puigpunyent	10	10	27/05/2015	03/12/2014	110	1	2	1
2014	Islas Baleares	Mallorca	Santa Eugènia	5	5	27/05/2015	03/12/2014	60	0	0	
2014	Islas Baleares	Mallorca	Santa María del Camí	11	11	27/05/2015	03/12/2014	132	9	20	1
2014	Islas Baleares	Mallorca	Soller	12	12	27/05/2015	03/12/2014	144	0	0	
2014	Islas Baleares	Mallorca	Valldemosa	6	6	27/05/2015	03/12/2014	72	0	0	
2014	País Vasco	Álava	San Millán/Donemiliaga	1	10	27/04/2014	01/09/2014	41957	0	0	
2014	País Vasco	Guipúzcoa	Hernani	2	18	10/06/2014	01/09/2014	41957	0	0	
2014	País Vasco	Guipúzcoa	Irún	4	30	16/10/2014	01/09/2014	41957	1	2	1
2014	País Vasco	Guipúzcoa	Oiartzun	1	10	30/03/2014	01/09/2014	41957	0	0	
2014	País Vasco	Guipúzcoa	Usurbil	2	20	18/07/2014	01/09/2014	41957	0	0	
2014	Región de Murcia	Murcia	Abanilla	8	8	23/09/2014	04/11/2014	24	0	0	
2014	Región de Murcia	Murcia	Águilas	78	78	10/09/2014	03/12/2014	373	32	57	
2014	Región de Murcia	Murcia	Alcantarilla	6	12	02/09/2014	09/12/2014	77	6	24	1
2014	Región de Murcia	Murcia	Alguazas	7	7	29/09/2014	12/11/2014	19	0	0	
2014	Región de Murcia	Murcia	Alhama De Murcia	16	32	02/09/2014	09/12/2014	200	3	3	1
2014	Región de Murcia	Murcia	Archena	5	5	29/09/2014	12/11/2014	15	0	0	
2014	Región de Murcia	Murcia	Beniel	4	4	25/09/2014	06/11/2014	11	1	1	1
2014	Región de Murcia	Murcia	Cartagena	155	217	11/01/2014	23/12/2014	2497	94	497	
2014	Región de Murcia	Murcia	Ceutí	5	5	29/09/2014	12/11/2014	14	0	0	
2014	Región de Murcia	Murcia	Fortuna	4	4	23/09/2014	04/11/2014	12	0	0	
2014	Región de Murcia	Murcia	Fuente Álamo	8	8	30/09/2014	13/11/2014	23	1	1	1
2014	Región de Murcia	Murcia	La Unión	9	13	25/01/2014	11/12/2014	109	0	0	
2014	Región de Murcia	Murcia	Librilla	4	8	02/09/2014	09/12/2014	48	0	0	
2014	Región de Murcia	Murcia	Lorca	77	77	30/09/2014	29/10/2014	300	0	0	
2014	Región de Murcia	Murcia	Lorquí	5	5	29/09/2014	12/11/2014	15	0	0	
2014	Región de Murcia	Murcia	Los Alcázares	5	5	25/01/2014	09/12/2014	54	2	7	1
2014	Región de Murcia	Murcia	Molina de Segura	17	17	29/09/2014	12/11/2014	47	1	1	1
2014	Región de Murcia	Murcia	Murcia	38	38	10/09/2014	23/10/2014	125	17	35	
2014	Región de Murcia	Murcia	Puerto Lumbreras	4	8	02/09/2014	09/12/2014	49	0	0	
2014	Región de Murcia	Murcia	San Javier	5	5	25/01/2014	16/05/2014	17	1	1	
2014	Región de Murcia	Murcia	San Pedro	2	3	29/05/2014	23/12/2014	35	2	8	
2014	Región de Murcia	Murcia	Santomera	5	5	25/09/2014	06/11/2014	15	0	0	
2014	Región de Murcia	Murcia	Torre Pacheco	14	14	30/09/2014	13/11/2014	41	1	1	1
2014	Región de Murcia	Murcia	Torres de Cotillas	5	5	29/09/2014	12/11/2014	15	2	2	1
2014	Región de Murcia	Murcia	Totana	6	6	26/09/2014	04/11/2014	18	0	0	
2015	Andalucía	Almería	Adra	3	6	17/08/2015	29/09/2015	18	0	0	
2015	Andalucía	Almería	Almería	5	10	17/08/2015	29/09/2015	29	0	0	
2015	Andalucía	Almería	Berja	1	2	17/08/2015	29/09/2015	6	0	0	
2015	Andalucía	Almería	Carboneras	3	6	17/08/2015	29/09/2015	17	0	0	
2015	Andalucía	Almería	Cuevas del Almanzora	4	8	17/08/2015	29/09/2015	24	2	5	1
2015	Andalucía	Almería	El Ejido	2	4	17/08/2015	29/09/2015	12	0	0	
2015	Andalucía	Almería	Garrucha	2	4	17/08/2015	29/09/2015	11	1	3	

2015	Andalucía	Almería	La Mojonera	1	2	17/08/2015	29/09/2015	4	0	0	
2015	Andalucía	Almería	Mojácar	2	4	17/08/2015	29/09/2015	12	1	2	1
2015	Andalucía	Almería	Níjar	4	8	17/08/2015	29/09/2015	24	0	0	
2015	Andalucía	Almería	Pulpí	2	4	17/08/2015	29/09/2015	12	2	6	
2015	Andalucía	Almería	Roquetas de Mar	3	6	17/08/2015	29/09/2015	12	0	0	
2015	Andalucía	Almería	Vera	2	4	17/08/2015	29/09/2015	11	0	0	
2015	Andalucía	Almería	Vícar	1	2	17/08/2015	29/09/2015	6	0	0	
2015	Andalucía	Cádiz	Algeciras	5	10	01/09/2015	30/09/2015	20	1	1	1
2015	Andalucía	Cádiz	Barbate	4	8	01/09/2015	05/10/2015	15	0	0	
2015	Andalucía	Cádiz	Cádiz	3	6	01/09/2015	05/10/2015	11	0	0	
2015	Andalucía	Cádiz	Chiclana de la Frontera	5	10	01/09/2015	05/10/2015	17	0	0	
2015	Andalucía	Cádiz	Chipiona	4	8	01/09/2015	05/10/2015	15	0	0	
2015	Andalucía	Cádiz	Conil de la Frontera	3	6	01/09/2015	05/10/2015	11	0	0	
2015	Andalucía	Cádiz	El Puerto de Santa María	3	6	01/09/2015	05/10/2015	12	0	0	
2015	Andalucía	Cádiz	Jerez de la Frontera	3	6	01/09/2015	05/10/2015	5	0	0	
2015	Andalucía	Cádiz	La Línea de la Concepción	1	2	30/08/2015	05/10/2015	4	0	0	
2015	Andalucía	Cádiz	Puerto Real	2	4	30/08/2015	05/10/2015	7	0	0	
2015	Andalucía	Cádiz	Rota	4	8	30/08/2015	05/10/2015	16	0	0	
2015	Andalucía	Cádiz	San Fernando	3	6	30/08/2015	05/10/2015	10	0	0	
2015	Andalucía	Cádiz	San Roque	5	10	30/08/2015	05/10/2015	20	0	0	
2015	Andalucía	Cádiz	Sanlúcar de Barrameda	5	10	30/08/2015	05/10/2015	20	0	0	
2015	Andalucía	Cádiz	Tarifa	6	12	30/08/2015	05/10/2015	23	0	0	
2015	Andalucía	Cádiz	Trebujena	1	2	30/08/2015	05/10/2015	4	0	0	
2015	Andalucía	Granada	Albuñol	1	2	18/08/2015	30/09/2015	4	0	0	
2015	Andalucía	Granada	Almuñécar	5	10	18/08/2015	30/09/2015	28	4	14	1
2015	Andalucía	Granada	Granada	18	36	20/08/2015	02/10/2015	93	4	6	1
2015	Andalucía	Granada	Gualchos	2	4	18/08/2015	30/09/2015	10	1	1	
2015	Andalucía	Granada	Motril	8	16	18/08/2015	30/09/2015	43	0	0	
2015	Andalucía	Granada	Polopos	2	4	18/08/2015	30/09/2015	12	0	0	
2015	Andalucía	Granada	Rubite	1	2	18/08/2015	30/09/2015	6	0	0	
2015	Andalucía	Granada	Salobreña	2	4	18/08/2015	30/09/2015	11	0	0	
2015	Andalucía	Huelva	Huelva	1	2	07/09/2015	05/10/2015	4	0	0	
2015	Andalucía	Huelva	Palos La Rabida	1	2	07/09/2015	05/10/2015	4	0	0	
2015	Andalucía	Huelva	Punta Umbría	1	2	07/09/2015	05/10/2015	4	0	0	
2015	Andalucía	Málaga	Alhaurín de la Torre	3	6	19/08/2015	01/10/2015	15	2	4	
2015	Andalucía	Málaga	Benalmádena	5	10	19/08/2015	01/10/2015	28	5	20	1
2015	Andalucía	Málaga	Casares	1	2	18/08/2015	30/09/2015	4	0	0	
2015	Andalucía	Málaga	El Algarrobo	1	2	18/08/2015	30/09/2015	6	1	1	1
2015	Andalucía	Málaga	Estepona	5	10	18/08/2015	30/09/2015	28	1	1	1
2015	Andalucía	Málaga	Fuengirola	2	4	19/08/2015	01/10/2015	11	1	1	1
2015	Andalucía	Málaga	Málaga	6	12	18/08/2015	30/09/2015	32	2	3	1
2015	Andalucía	Málaga	Manilva	3	6	19/08/2015	01/10/2015	18	0	0	
2015	Andalucía	Málaga	Marbella	9	18	19/08/2015	01/10/2015	51	4	13	1
2015	Andalucía	Málaga	Mijas	4	8	18/08/2015	30/09/2015	23	2	8	1
2015	Andalucía	Málaga	Nerja	3	6	18/08/2015	30/09/2015	14	1	3	1
2015	Andalucía	Málaga	Rincón de la Victoria	3	6	18/08/2015	30/09/2015	18	1	3	1
2015	Andalucía	Málaga	Torremolinos	3	6	19/08/2015	01/10/2015	18	3	7	1
2015	Andalucía	Málaga	Torrox	2	4	18/08/2015	30/09/2015	10	0	0	
2015	Andalucía	Málaga	Vélez-Málaga	3	12	18/08/2015	30/09/2015	35	0	0	
2015	Andalucía	Sevilla	Bormujos	1	2	31/08/2015	05/10/2015	4	0	0	
2015	Andalucía	Sevilla	Dos Hermanas	1	2	31/08/2015	05/10/2015	4	0	0	
2015	Andalucía	Sevilla	Las Cabezas de San Juan	1	2	31/08/2015	05/10/2015	4	0	0	
2015	Andalucía	Sevilla	Lebrija	1	2	31/08/2015	05/10/2015	3	0	0	
2015	Andalucía	Sevilla	Los Palacios y Villafranca	2	4	31/08/2015	05/10/2015	8	0	0	
2015	Andalucía	Sevilla	Sevilla	10	20	31/08/2015	05/10/2015	37	0	0	
2015	Andalucía	Sevilla	Tomares	1	2	31/08/2015	05/10/2015	4	0	0	
2015	Aragón	Huesca	Huesca	1	10	01/09/2015	01/10/2015	29	1	5	1
2015	Com. Valenciana	Alicante	Elche	9	27	16/09/2015	13/11/2015	85	3	6	
2015	Com. Valenciana	Alicante	Los Montesinos	2	2	30/06/2015	26/12/2015	24	1	8	

2015	Com. Valenciana	Alicante	Orihuela	7	21	17/09/2015	13/11/2015	59	0	0	
2015	Com. Valenciana	Castellón	Benicasim	9	9	12/08/2015	29/12/2015	72	9	62	
2015	Com. Valenciana	Valencia	Almussafes	6	18	17/09/2015	15/10/2015	33	3	4	1
2015	Com. Valenciana	Valencia	Gandía	3	12	20/08/2015	26/11/2015	90	66	54	
2015	Com. Valenciana	Valencia	L'Eliana	7	14	11/09/2015	15/10/2015	28	13	20	1
2015	Com. Valenciana	Valencia	Manises	2	4	10/07/2015	13/11/2015	17	0	0	
2015	Com. Valenciana	Valencia	Torrent	7	14	09/09/2015	23/09/2015	14	7	12	1
2015	Com. Valenciana	Valencia	Valencia	3	6	10/07/2015	13/11/2015	16	1	11	
2015	Islas Baleares	Mallorca	Alaró	5	5	27/05/2015	03/12/2015	9	0	0	
2015	Islas Baleares	Mallorca	Algaida	7	7	03/06/2015	15/11/2015	83	3	14	
2015	Islas Baleares	Mallorca	Andratx	20	20	03/06/2015	15/11/2015	229	17	71	
2015	Islas Baleares	Mallorca	Banyalbufar	4	4	03/06/2015	15/11/2015	34	4	23	
2015	Islas Baleares	Mallorca	Bunyola	4	4	03/06/2015	15/11/2015	47	4	46	
2015	Islas Baleares	Mallorca	Calvià	55	55	03/06/2015	15/11/2015	547	52	223	
2015	Islas Baleares	Mallorca	Deià	7	7	03/06/2015	15/11/2015	79	5	20	1
2015	Islas Baleares	Mallorca	Esporles	6	6	03/06/2015	15/11/2015	51	6	30	
2015	Islas Baleares	Mallorca	Inca	6	6	03/06/2015	15/11/2015	22	2	3	1
2015	Islas Baleares	Mallorca	Llucmajor	48	48	03/06/2015	15/11/2015	486	42	167	
2015	Islas Baleares	Mallorca	Marratxí	34	34	03/06/2015	15/11/2015	398	34	266	
2015	Islas Baleares	Mallorca	Palma de Mallorca	2	23	27/07/2015	14/11/2015	136	2	40	
2015	Islas Baleares	Mallorca	Puigpunyent	10	10	03/06/2015	15/11/2015	115	6	37	
2015	Islas Baleares	Mallorca	Santa Eugènia	5	5	03/06/2015	15/11/2015	60	5	22	1
2015	Islas Baleares	Mallorca	Santa María del Camí	11	11	03/06/2015	15/11/2015	119	10	46	
2015	Islas Baleares	Mallorca	Soller	14	14	03/06/2015	15/11/2015	138	12	62	1
2015	Islas Baleares	Mallorca	Valldemosa	6	6	03/06/2015	15/11/2015	68	4	9	1
2015	Islas Baleares	Menorca	Ciudadella de Menorca	1	1	30/07/2015	23/10/2015	3	0	0	
2015	Islas Baleares	Menorca	Mahón	9	9	30/07/2015	23/10/2015	39	2	5	1
2015	País Vasco	Álava	Urkabustaiz	1	2	28/08/2015	13/11/2015	12	0	0	
2015	País Vasco	Álava	Zuia	1	6	28/08/2015	13/11/2015	36	0	0	
2015	País Vasco	Guipúzcoa	Irún	5	48	29/06/2015	23/11/2016	624	2	15	
2015	País Vasco	Vizcaya	Amorebieta-Etxano	2	8	28/08/2015	13/11/2015	48	0	0	
2015	País Vasco	Vizcaya	Arrigorriaga	1	3	28/08/2015	13/11/2015	18	0	0	
2015	País Vasco	Vizcaya	Ugao-Miraballes	1	5	28/08/2015	13/11/2015	30	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Abanilla	8	8	17/06/2015	18/11/2015	86	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Abarán	5	5	16/06/2015	23/08/2015	53	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Águilas	32	50	08/09/2015	29/12/2015	238	29	102	
2015	Región de Murcia	Murcia	Albudeite	6	6	18/06/2015	19/11/2015	65	1	1	1
2015	Región de Murcia	Murcia	Alguazas	15	30	15/06/2015	26/10/2015	166	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Alhama de Murcia	7	7	18/06/2015	19/11/2015	72	3	11	
2015	Región de Murcia	Murcia	Archena	5	5	15/06/2015	16/11/2015	55	1	1	1
2015	Región de Murcia	Murcia	Beniel	4	4	17/06/2015	18/11/2015	54	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Blanca	6	6	16/06/2015	23/08/2015	54	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Campos del Río	4	4	18/06/2015	19/11/2015	43	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Cartagena	38	53	19/06/2015	31/12/2015	427	30	144	
2015	Región de Murcia	Murcia	Ceutí	5	5	15/06/2015	16/11/2015	50	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Cieza	7	7	16/06/2015	23/08/2015	68	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Fortuna	4	4	17/06/2015	18/11/2015	39	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Fuente Álamo	4	4	19/06/2015	22/11/2015	33	1	3	
2015	Región de Murcia	Murcia	Jumilla	11	20	03/03/2015	29/11/2015	301	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	La Unión	4	7	19/06/2015	31/12/2015	94	2	11	1
2015	Región de Murcia	Murcia	Librilla	5	5	18/06/2015	19/11/2015	54	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Lorca	16	32	04/09/2015	27/10/2015	106	2	4	1
2015	Región de Murcia	Murcia	Lorquí	5	5	15/06/2015	16/11/2015	54	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Los Alcázares	2	4	07/08/2015	31/12/2015	48	1	6	
2015	Región de Murcia	Murcia	Mazarrón	3	3	19/06/2015	22/11/2015	42	4	24	
2015	Región de Murcia	Murcia	Molina de Segura	17	17	15/06/2015	16/11/2015	179	1	1	
2015	Región de Murcia	Murcia	Mula	7	7	18/06/2015	19/11/2015	75	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Murcia	13	13	02/02/2015	31/12/2015	185	4	37	
2015	Región de Murcia	Murcia	Ojós	2	2	16/06/2015	23/08/2015	22	0	0	

2015	Región de Murcia	Murcia	Ricote	4	4	16/06/2015	23/08/2015	43	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Santomera	5	5	17/06/2015	18/11/2015	50	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Torre Pacheco	2	2	19/06/2015	22/11/2015	22	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Torres de Cotillas	5	5	15/06/2015	16/11/2015	51	5	12	
2015	Región de Murcia	Murcia	Totana	5	5	18/06/2015	19/11/2015	45	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Ulea	3	3	16/06/2015	23/08/2015	29	0	0	
2015	Región de Murcia	Murcia	Villanueva del Río Segura	4	4	16/06/2015	23/08/2015	41	0	0	
2016	Andalucía	Almería	Adra	3	6	16/08/2016	01/09/2016	18	0	0	
2016	Andalucía	Almería	Almería	5	10	16/08/2016	01/09/2016	28	0	0	
2016	Andalucía	Almería	Berja	1	2	16/08/2016	01/09/2016	5	0	0	
2016	Andalucía	Almería	Carboneras	3	6	16/08/2016	01/09/2016	18	2	5	1
2016	Andalucía	Almería	Cuevas del Almanzora	4	8	16/08/2016	01/09/2016	24	2	5	
2016	Andalucía	Almería	El Ejido	10	20	16/08/2016	19/10/2016	66	0	0	
2016	Andalucía	Almería	Garrucha	2	4	16/08/2016	01/09/2016	9	1	2	
2016	Andalucía	Almería	La Mojonesa	1	2	16/08/2016	01/09/2016	6	0	0	
2016	Andalucía	Almería	Mojácar	2	4	16/08/2016	01/09/2016	12	2	3	
2016	Andalucía	Almería	Níjar	4	8	16/08/2016	01/09/2016	23	0	0	
2016	Andalucía	Almería	Pulpí	2	4	16/08/2016	01/09/2016	12	2	6	
2016	Andalucía	Almería	Roquetas de Mar	3	6	16/08/2016	01/09/2016	18	0	0	
2016	Andalucía	Almería	Vera	2	4	16/08/2016	01/09/2016	12	0	0	
2016	Andalucía	Almería	Vícar	1	2	16/08/2016	01/09/2016	6	0	0	
2016	Andalucía	Cádiz	Algeciras	9	10	06/10/2016	03/11/2016	20	2	4	
2016	Andalucía	Cádiz	Barbate	9	13	06/10/2016	03/11/2016	19	0	0	
2016	Andalucía	Cádiz	Barrios (Los)	3	3	06/10/2016	03/11/2016	3	0	0	
2016	Andalucía	Cádiz	Cádiz	4	6	06/10/2016	03/11/2016	8	0	0	
2016	Andalucía	Cádiz	Chiclana de la Frontera	7	11	07/10/2016	04/11/2016	16	0	0	
2016	Andalucía	Cádiz	Chipiona	6	6	07/10/2016	04/11/2016	6	0	0	
2016	Andalucía	Cádiz	Conil de la Frontera	7	8	07/10/2016	04/11/2016	14	0	0	
2016	Andalucía	Cádiz	Jerez de la Frontera	5	6	07/10/2016	04/11/2016	8	0	0	
2016	Andalucía	Cádiz	Línea de la Concepción (La)	5	8	07/10/2016	04/11/2016	12	0	0	
2016	Andalucía	Cádiz	Puerto de Santa María (El)	3	5	07/10/2016	04/11/2016	8	0	0	
2016	Andalucía	Cádiz	Puerto Real	5	6	07/10/2016	04/11/2016	10	0	0	
2016	Andalucía	Cádiz	Rota	11	11	07/10/2016	04/11/2016	19	0	0	
2016	Andalucía	Cádiz	San Fernando	4	6	07/10/2016	04/11/2016	10	0	0	
2016	Andalucía	Cádiz	San Roque	5	9	07/10/2016	04/11/2016	19	1	1	1
2016	Andalucía	Cádiz	Sanlúcar de Barrameda	10	12	10/11/2016	08/11/2016	21	0	0	
2016	Andalucía	Cádiz	Tarifa	7	10	10/11/2016	08/11/2016	19	0	0	
2016	Andalucía	Cádiz	Trebujena	2	2	10/11/2016	08/11/2016	3	0	0	
2016	Andalucía	Cádiz	Vejer de la Frontera	1	2	10/11/2016	08/11/2016	0	0	0	
2016	Andalucía	Granada	Albuñol	1	2	16/08/2016	01/09/2016	6	0	0	
2016	Andalucía	Granada	Almuñécar	5	10	16/08/2016	01/09/2016	25	5	13	
2016	Andalucía	Granada	Granada	24	42	23/05/2016	01/09/2016	115	9	19	
2016	Andalucía	Granada	Gualchos	2	4	16/08/2016	01/09/2016	12	2	3	
2016	Andalucía	Granada	Motril	8	16	16/08/2016	01/09/2016	45	0	0	
2016	Andalucía	Granada	Polopos	2	4	16/08/2016	01/09/2016	11	0	0	
2016	Andalucía	Granada	Rubite	1	2	16/08/2016	01/09/2016	6	1	3	1
2016	Andalucía	Granada	Salobreña	2	4	16/08/2016	01/09/2016	12	1	1	1
2016	Andalucía	Huelva	Almonte	4	4	19/10/2016	16/11/2016	7	0	0	
2016	Andalucía	Huelva	Chucena	1	1	19/10/2016	16/11/2016	2	0	0	
2016	Andalucía	Huelva	Huelva	2	3	19/10/2016	16/11/2016	4	0	0	
2016	Andalucía	Huelva	Manzanilla	1	1	19/10/2016	16/11/2016	2	0	0	
2016	Andalucía	Huelva	Palos de la Frontera	2	2	19/10/2016	16/11/2016	4	0	0	
2016	Andalucía	Huelva	Punta Umbría	2	2	19/10/2016	16/11/2016	3	0	0	
2016	Andalucía	Málaga	Alhaurín de la Torre	5	11	09/02/2016	02/11/2016	186	4	93	
2016	Andalucía	Málaga	Benalmádena	9	18	09/02/2016	02/11/2016	295	9	111	
2016	Andalucía	Málaga	Casares	1	2	16/08/2016	01/09/2016	6	0	0	
2016	Andalucía	Málaga	El Algarrobo	1	2	16/08/2016	01/09/2016	5	0	0	
2016	Andalucía	Málaga	Estepona	5	10	16/08/2016	01/09/2016	29	3	6	
2016	Andalucía	Málaga	Fuengirola	2	4	16/08/2016	01/09/2016	11	1	3	

2016	Andalucía	Málaga	Málaga	6	12	16/08/2016	01/09/2016	32	4	7	
2016	Andalucía	Málaga	Manilva	3	6	16/08/2016	01/09/2016	18	1	1	1
2016	Andalucía	Málaga	Marbella	9	18	16/08/2016	01/09/2016	52	6	13	
2016	Andalucía	Málaga	Mijas	4	8	16/08/2016	01/09/2016	23	4	10	
2016	Andalucía	Málaga	Nerja	3	6	16/08/2016	01/09/2016	18	3	7	
2016	Andalucía	Málaga	Rincón de la Victoria	3	6	16/08/2016	01/09/2016	17	3	5	
2016	Andalucía	Málaga	Torremolinos	5	10	09/02/2016	02/11/2016	150	5	48	
2016	Andalucía	Málaga	Torrox	2	4	16/08/2016	01/09/2016	12	0	0	
2016	Andalucía	Málaga	Vélez-Málaga	6	12	16/08/2016	01/09/2016	35	2	5	1
2016	Andalucía	Sevilla	Bollullos de la Mitación	3	4	19/10/2016	16/11/2016	7	0	0	
2016	Andalucía	Sevilla	Bormujos	1	2	19/10/2016	16/11/2016	3	0	0	
2016	Andalucía	Sevilla	Cabezas de San Juan (Las)	2	2	10/11/2016	08/11/2016	3	0	0	
2016	Andalucía	Sevilla	Dos Hermanas	3	4	10/11/2016	08/11/2016	4	0	0	
2016	Andalucía	Sevilla	Lebrija	1	1	10/11/2016	08/11/2016	2	0	0	
2016	Andalucía	Sevilla	Palacios y Villafranca (Los)	3	4	10/11/2016	08/11/2016	8	0	0	
2016	Andalucía	Sevilla	Sevilla	14	18	19/10/2016	16/11/2016	34	0	0	
2016	Andalucía	Sevilla	Tomares	2	2	19/10/2016	16/11/2016	4	0	0	
2016	Aragón	Huesca	Barbastro	5	10	10/05/2016	25/10/2016	128	1	2	1
2016	Aragón	Huesca	Binéfar	5	10	18/05/2016	19/10/2016	119	0	0	
2016	Aragón	Huesca	Fraga	6	12	06/05/2016	21/10/2016	130	1	1	1
2016	Aragón	Huesca	Huesca	6	16	13/05/2016	10/10/2016	176	0	0	
2016	Aragón	Huesca	Jaca	6	12	17/05/2016	18/10/2016	142	0	0	
2016	Aragón	Huesca	Monzón	15	29	05/05/2016	21/10/2016	219	11	48	1
2016	Aragón	Huesca	Sabiñánigo	5	10	17/05/2016	18/10/2016	120	0	0	
2016	Aragón	Teruel	Albarracín	4	8	01/06/2016	19/10/2016	64	0	0	
2016	Aragón	Teruel	Alcañiz	5	10	11/05/2016	26/10/2016	120	1	1	1
2016	Aragón	Teruel	Calaceite	4	8	11/05/2016	26/10/2016	96	3	7	1
2016	Aragón	Teruel	Teruel	5	11	04/05/2016	19/10/2016	121	0	0	
2016	Aragón	Teruel	Villarquemado	4	8	04/05/2016	19/10/2016	96	0	0	
2016	Aragón	Zaragoza	Alfajarín	4	7	02/06/2016	20/10/2016	77	1	3	1
2016	Aragón	Zaragoza	Burgo de Ebro	5	10	23/05/2016	12/10/2016	109	0	0	
2016	Aragón	Zaragoza	Cadrete	3	6	08/06/2016	26/10/2016	60	0	0	
2016	Aragón	Zaragoza	Calatayud	5	10	27/05/2016	14/10/2016	98	0	0	
2016	Aragón	Zaragoza	Caspe	5	10	19/05/2016	19/10/2016	90	2	13	1
2016	Aragón	Zaragoza	Cuarte de Huerva	5	10	08/06/2016	26/10/2016	98	0	0	
2016	Aragón	Zaragoza	La Joyosa	3	6	31/05/2016	19/10/2016	48	2	14	1
2016	Aragón	Zaragoza	Mequinenza	5	10	23/05/2016	24/10/2016	100	2	2	1
2016	Aragón	Zaragoza	Utebo	5	10	30/05/2016	18/10/2016	83	0	0	
2016	Aragón	Zaragoza	Zuera	4	8	30/05/2016	18/10/2016	80	0	0	
2016	Com. Valenciana	Alicante	Albatera	5	10	17/09/2016	08/11/2016	43	0	0	
2016	Com. Valenciana	Alicante	Catral	5	10	17/09/2016	08/11/2016	45	3	6	1
2016	Com. Valenciana	Alicante	Crevillente	17	34	07/12/2016	28/11/2016	285	0	0	
2016	Com. Valenciana	Alicante	Dolores	4	8	27/09/2016	18/11/2016	40	1	1	
2016	Com. Valenciana	Alicante	Los Montesinos	1	1	09/02/2016	31/12/2016	41	1	16	
2016	Com. Valenciana	Alicante	Orihuela	16	33	06/09/2016	02/11/2016	115	6	17	
2016	Com. Valenciana	Alicante	Torrevieja	10	20	07/09/2016	07/11/2016	69	9	45	
2016	Com. Valenciana	Castellón	Benicasim	3	9	13/01/2015	22/08/2016	151	3	73	
2016	Com. Valenciana	Valencia	Gandía	3	12	18/01/2016	27/09/2016	239	3	84	
2016	Com. Valenciana	Valencia	Valencia	3	6	15/06/2016	15/10/2016	22	1	1	
2016	Islas Baleares	Mallorca	Alaró	5	5	17/06/2016	16/11/2016	50	4	22	1
2016	Islas Baleares	Mallorca	Algaida	7	7	16/05/2016	16/11/2016	84	6	28	
2016	Islas Baleares	Mallorca	Andratx	20	20	13/05/2016	16/11/2016	228	19	129	
2016	Islas Baleares	Mallorca	Banyalbufar	5	5	13/05/2016	16/11/2016	48	4	29	
2016	Islas Baleares	Mallorca	Binissalem	5	5	27/05/2016	16/11/2016	55	5	32	1
2016	Islas Baleares	Mallorca	Bunyola	6	6	16/05/2016	16/11/2016	72	6	50	
2016	Islas Baleares	Mallorca	Capdepera	23	23	02/06/2016	16/11/2016	253	18	85	1
2016	Islas Baleares	Mallorca	Consell	5	5	03/08/2016	16/11/2016	35	4	18	1
2016	Islas Baleares	Mallorca	Costitx	1	2	05/08/2016	16/11/2016	8	2	8	1
2016	Islas Baleares	Mallorca	Deià	7	7	13/05/2016	16/11/2016	72	6	30	

2016	Islas Baleares	Mallorca	Esporles	6	6	13/05/2016	16/11/2016	72	6	46	
2016	Islas Baleares	Mallorca	Estellencs	2	2	13/05/2016	16/11/2016	22	2	17	1
2016	Islas Baleares	Mallorca	Inca	6	6	15/06/2016	16/11/2016	60	6	26	
2016	Islas Baleares	Mallorca	Llucmajor	16	16	17/05/2016	16/11/2016	192	15	98	
2016	Islas Baleares	Mallorca	Manacor	4	4	03/06/2016	16/11/2016	44	2	3	1
2016	Islas Baleares	Mallorca	Marratxi	34	34	16/05/2016	16/11/2016	408	30	263	
2016	Islas Baleares	Mallorca	Palma de Mallorca	2	10	15/07/2016	16/11/2016	98	3	76	
2016	Islas Baleares	Mallorca	Puigpunyent	10	10	13/05/2016	16/11/2016	120	10	46	
2016	Islas Baleares	Mallorca	Sant Llorenç des Cardassar	10	10	06/07/2016	16/11/2016	90	0	0	
2016	Islas Baleares	Mallorca	Santa Eugènia	5	5	16/05/2016	16/11/2016	60	5	41	
2016	Islas Baleares	Mallorca	Santa María del Camí	11	11	16/05/2016	16/11/2016	120	10	49	
2016	Islas Baleares	Mallorca	Selva	1	1	05/08/2016	16/11/2016	1	1	1	1
2016	Islas Baleares	Mallorca	Ses Salines	5	5	03/06/2016	16/11/2016	55	1	3	1
2016	Islas Baleares	Mallorca	Sòller	14	14	13/05/2016	16/11/2016	144	11	51	
2016	Islas Baleares	Mallorca	Son Servera	10	10	14/07/2016	16/11/2016	80	10	31	1
2016	Islas Baleares	Mallorca	Valldemossa	6	6	13/05/2016	16/11/2016	72	6	11	
2016	Madrid	Madrid	Madrid	4	8	01/07/2016	05/10/2016	40	0	0	
2016	Madrid	Madrid	Torrejón de Ardoz	4	8	23/06/2016	11/10/2016	40	0	0	
2016	País Vasco	Alava	San Millán/Donemiliaga	1	10	30/11/2016	23/11/2016	168	0	0	
2016	País Vasco	Alava	Vitoria-Gasteiz	2	20	11/01/2016	23/11/2016	328	0	0	
2016	País Vasco	Alava	Zuia	1	10	02/02/2016	23/11/2016	169	0	0	
2016	País Vasco	Guipúzcoa	Donostia-San Sebastián	3	30	06/01/2015	23/11/2016	484	0	0	
2016	País Vasco	Guipúzcoa	Hondarribia	2	20	23/11/2016	23/11/2016	333	0	0	
2016	País Vasco	Guipúzcoa	Irún	5	50	04/01/2016	23/11/2016	835	2	5	
2016	País Vasco	Guipúzcoa	Usurbil	1	10	26/01/2016	23/11/2016	163	0	0	
2016	País Vasco	Vizcaya	Arrigorriaga	1	3	30/12/2014	23/11/2016	50	0	0	
2016	País Vasco	Vizcaya	Barakaldo	1	10	16/11/2016	23/11/2016	167	0	0	
2016	País Vasco	Vizcaya	Basauri	1	10	28/12/2015	23/11/2016	170	0	0	
2016	País Vasco	Vizcaya	Bilbao	2	20	19/01/2016	23/11/2016	316	0	0	
2016	País Vasco	Vizcaya	Ugao-Miraballes	1	7	23/12/2014	23/11/2016	118	0	0	
2016	Región de Murcia	Murcia	Abanilla	8	16	11/08/2016	22/09/2016	41	1	2	1
2016	Región de Murcia	Murcia	Abarán	5	10	09/08/2016	20/09/2016	25	0	0	
2016	Región de Murcia	Murcia	Águilas	36	72	17/05/2016	15/12/2016	1107	35	378	
2016	Región de Murcia	Murcia	Albudeite	6	12	10/08/2016	21/09/2016	32	0	0	
2016	Región de Murcia	Murcia	Alcantarilla	1	Adultos	01/09/2016	--	--	1	--	
2016	Región de Murcia	Murcia	Alguazas	15	30	08/07/2016	03/11/2016	217	2	4	1
2016	Región de Murcia	Murcia	Archena	5	10	09/08/2016	20/09/2016	29	0	0	
2016	Región de Murcia	Murcia	Beniel	8	16	11/08/2016	22/09/2016	42	1	1	
2016	Región de Murcia	Murcia	Blanca	6	12	09/08/2016	20/09/2016	33	0	0	
2016	Región de Murcia	Murcia	Bullas	5	10	10/08/2016	21/09/2016	26	1	1	1
2016	Región de Murcia	Murcia	Campos del Río	4	8	10/08/2016	21/09/2016	23	1	1	1
2016	Región de Murcia	Murcia	Cartagena	21	42	05/10/2016	20/12/2016	544	19	194	
2016	Región de Murcia	Murcia	Cehegín	5	10	10/08/2016	21/09/2016	25	0	0	
2016	Región de Murcia	Murcia	Ceutí	5	10	09/08/2016	20/09/2016	29	1	1	1
2016	Región de Murcia	Murcia	Cieza	7	14	09/08/2016	20/09/2016	38	0	0	
2016	Región de Murcia	Murcia	Fortuna	4	8	11/08/2016	22/09/2016	24	0	0	
2016	Región de Murcia	Murcia	Jumilla	11	31	02/05/2016	14/11/2016	346	0	0	
2016	Región de Murcia	Murcia	Librilla	5	10	10/08/2016	21/09/2016	29	4	11	1
2016	Región de Murcia	Murcia	Lorca	18	36	09/05/2016	05/12/2016	142	2	4	
2016	Región de Murcia	Murcia	Lorquí	5	10	09/08/2016	21/09/2016	29	2	2	1
2016	Región de Murcia	Murcia	Mazarrón	2	Adultos	01/07/2016	15/10/2016	--	2	--	
2016	Región de Murcia	Murcia	Molina de Segura	2	Adultos	06/06/2016	12/11/2016	--	2	--	
2016	Región de Murcia	Murcia	Mula	8	16	10/08/2016	21/09/2016	48	0	0	
2016	Región de Murcia	Murcia	Murcia	5	5	14/01/2016	30/12/2016	196	4	37	
2016	Región de Murcia	Murcia	Ojós	2	4	09/08/2016	20/09/2016	9	0	0	
2016	Región de Murcia	Murcia	Puerto Lumbresas	7	14	17/08/2015	30/09/2015	39	0	0	
2016	Región de Murcia	Murcia	Ricote	4	8	09/08/2016	20/09/2016	20	0	0	
2016	Región de Murcia	Murcia	Santomera	5	10	11/08/2016	22/09/2016	29	0	0	
2016	Región de Murcia	Murcia	Ulea	3	6	09/08/2016	20/09/2016	18	0	0	
2016	Región de Murcia	Murcia	Villanueva del Río Segura	4	8	09/08/2016	20/09/2016	20	0	0	

Tabla 2. Secuencias incluidas en las redes de haplotipos para los genes COI e ITS2

Gen	País	Referencia	nº acceso Genbank	nº secuencias
ITS2	Japón	Higa Y1, Toma T, Tsuda Y, Miyagi I. 2010. A multiplex PCR-based molecular identification of five morphologically related, medically important subgenus <i>Stegomyia</i> mosquitoes from the genus <i>Aedes</i> (Diptera: Culicidae) found in the Ryukyu Archipelago, Japan. <i>Jpn J Infect Dis.</i> 63(5):312-6.	AB548788 - AB548795	8
ITS2	China	Luo J and Jun L. Internal transcribed spacer 2 of <i>Aedes albopictus</i> in China	DQ168420	1
ITS2	China	Yajun M and Fengyi Q. Molecular phylogeny of seven genuses in culicidea, using rDNA-ITS2	AF305554	1
ITS2	Grecia	Patsoula E, Samanidou-Voyadjoglou A, Spanakos G, Kremastinou J, Nasioulas G, Vakalis NC. Molecular and morphological characterization of <i>Aedes albopictus</i> in northwestern Greece and differentiation from <i>Aedes cretinus</i> and <i>Aedes aegypti</i> . <i>J Med Entomol.</i> 2006 Jan;43(1):40-54.	AY741376, AY741377	2
ITS2	USA	Wesson DM, Porter CH, Collins FH. Sequence and secondary structure comparisons of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). <i>Mol Phylogenet Evol.</i> 1992 Dec;1(4):253-69.	M95127	1
ITS2	Italia	Shaikevich, E. y Talbalaghi, A. (2013). Molecular characterization of the Asian Tiger mosquito <i>Ae. albopictus</i> (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Northern Italy. <i>ISRN Entomology</i> ; 2013: 6.	JX679387-JX679398	12
ITS2	Francia	De Jong 2009. Molecular characterization of the invasive Asian tiger mosquito, <i>Aedes</i> (<i>Stegomyia</i>) <i>albopictus</i> (Diptera: Culicidae) in Corsica	AB231675, L22060	2
ITS2	Tailandia	Manni, M., Gomulski, L.M., Aketarawong, N. y cols. (2015). Molecular markers for analyses of intraspecific genetic diversity in the Asian Tiger mosquito, <i>Ae. albopictus</i> . <i>Parasites & Vectors</i> ; 8:188.	KY703644, KY703649-KY703653, KY703660-KY703663, KY703665, KY703670, KY703680, KY703682, KY703691, KY703695	16
ITS2	La Reunión	Manni, M., Gomulski, L.M., Aketarawong, N. y cols. (2015). Molecular markers for analyses of intraspecific genetic diversity in the Asian Tiger mosquito, <i>Ae. albopictus</i> . <i>Parasites & Vectors</i> ; 8:188.	KY703646, KY703659, KY703667, KY703676, KY703677, KY703681, KY703683, KY703693	8

ITS2	Italia	Manni, M., Gomulski, L.M., Aketarawong, N. y cols. (2015). Molecular markers for analyses of intraspecific genetic diversity in the Asian Tiger mosquito, <i>Ae. albopictus</i> . <i>Parasites & Vectors</i> ; 8:188.	KY703645, KY703647, KY703648, KY703654-KY703658, KY703664, KY703666, KY703668, KY703669, KY703671-KY703675, KY703678, KY703679, KY703684-KY703690, KY703692, KY703694	28
COI	Italia	Battaglia, V., Gabrieli, P., Brandini, S. y cols. (2016). The Worldwide Spread of the Tiger Mosquito as Revealed by Mitogenome Haplogroup Diversity. <i>Frontiers in Genetics</i> ; 7: 208.	KX383916, KX383918, KX383920, KX383921, KX383922, KX383923, KX383929, KX383933	8
COI	EEUU	Battaglia, V., Gabrieli, P., Brandini, S. y cols. (2016). The Worldwide Spread of the Tiger Mosquito as Revealed by Mitogenome Haplogroup Diversity. <i>Frontiers in Genetics</i> ; 7: 208.	KX383917, KX383919	2
COI	Brasil	Battaglia, V., Gabrieli, P., Brandini, S. y cols. (2016). The Worldwide Spread of the Tiger Mosquito as Revealed by Mitogenome Haplogroup Diversity. <i>Frontiers in Genetics</i> ; 7: 208.	KX383924	1
COI	Tailandia	Battaglia, V., Gabrieli, P., Brandini, S. y cols. (2016). The Worldwide Spread of the Tiger Mosquito as Revealed by Mitogenome Haplogroup Diversity. <i>Frontiers in Genetics</i> ; 7: 208.	KX383925, KX383926, KX383928	3
COI	Albania	Battaglia, V., Gabrieli, P., Brandini, S. y cols. (2016). The Worldwide Spread of the Tiger Mosquito as Revealed by Mitogenome Haplogroup Diversity. <i>Frontiers in Genetics</i> ; 7: 208.	KX383930, KX383931	2
COI	China	Battaglia, V., Gabrieli, P., Brandini, S. y cols. (2016). The Worldwide Spread of the Tiger Mosquito as Revealed by Mitogenome Haplogroup Diversity. <i>Frontiers in Genetics</i> ; 7: 208.	KX383934	1
COI	Grecia	Battaglia, V., Gabrieli, P., Brandini, S. y cols. (2016). The Worldwide Spread of the Tiger Mosquito as Revealed by Mitogenome Haplogroup Diversity. <i>Frontiers in Genetics</i> ; 7: 208.	KX383927, KX383932	2
COI	Japón	Battaglia, V., Gabrieli, P., Brandini, S. y cols. (2016). The Worldwide Spread of the Tiger Mosquito as Revealed by Mitogenome Haplogroup Diversity. <i>Frontiers in Genetics</i> ; 7: 208.	KX809765	1

COI	Filipinas	Battaglia, V., Gabrieli, P., Brandini, S. y cols. (2016). The Worldwide Spread of the Tiger Mosquito as Revealed by Mitogenome Haplogroup Diversity. <i>Frontiers in Genetics</i> ; 7: 208.	KX383935, KX809761, KX809762, KX809764, KX809763	5
COI	Taiwan	Battaglia, V., Gabrieli, P., Brandini, S. y cols. (2016). The Worldwide Spread of the Tiger Mosquito as Revealed by Mitogenome Haplogroup Diversity. <i>Frontiers in Genetics</i> ; 7: 208.	NC006817	1
COI	China	Chen,L. 2015 Direct submission	KR068634	1
COI	Alemania	Kampen, H., Kronefeld, M., Zielke, D. y cols. (2013). Further specimens of the Asian tiger mosquito <i>Aedes albopictus</i> (Diptera, Culicidae) trapped in southwest Germany. <i>Parasitology Research</i> ; 112: 905–907.	JQ388786	1
COI	Japón	Kuwata 2012 Establishment and characterization of a cell line from the mosquito <i>Culex tritaeniorhynchus</i> (Diptera: Culicidae)	AB690835	1
COI	Brasil	Mousson, L., Dauga, C., Garrigues, T. y cols. (2005). Phylogeography of <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (L.) and <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. <i>Genetics Research</i> ; 86: 1-11.	AJ971003, AJ971014	2
COI	USA	Mousson, L., Dauga, C., Garrigues, T. y cols. (2005). Phylogeography of <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (L.) and <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. <i>Genetics Research</i> ; 86: 1-11.	AJ971005	1
COI	Camboya	Mousson, L., Dauga, C., Garrigues, T. y cols. (2005). Phylogeography of <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (L.) and <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. <i>Genetics Research</i> ; 86: 1-11.	AJ971006	1
COI	Madagascar	Mousson, L., Dauga, C., Garrigues, T. y cols. (2005). Phylogeography of <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (L.) and <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. <i>Genetics Research</i> ; 86: 1-11.	AJ971007	1
COI	Francia	Mousson, L., Dauga, C., Garrigues, T. y cols. (2005). Phylogeography of <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (L.) and <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. <i>Genetics Research</i> ; 86: 1-11.	AJ971008, AJ971009	2

COI	Vietnam	Mousson, L., Dauga, C., Garrigues, T. y cols. (2005). Phylogeography of <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (L.) and <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. <i>Genetics Research</i> ; 86: 1-11.	AJ971010	1
COI	Hawai	Mousson, L., Dauga, C., Garrigues, T. y cols. (2005). Phylogeography of <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (L.) and <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. <i>Genetics Research</i> ; 86: 1-11.	AJ971011	1
COI	Isla Reunión	Mousson, L., Dauga, C., Garrigues, T. y cols. (2005). Phylogeography of <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (L.) and <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. <i>Genetics Research</i> ; 86: 1-11.	AJ971012	1
COI	Tailandia	Mousson, L., Dauga, C., Garrigues, T. y cols. (2005). Phylogeography of <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (L.) and <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. <i>Genetics Research</i> ; 86: 1-11.	AJ971015	1
COI	Taiwan	Ho,C.-M., Chang,H.-P. and Liu,Y.-M. Direct submission	AY072044	1
COI	Australia	Ballard,J.W.O., Puslednik,L. and Wolff,J.N. Direct submission	GQ143719	1
COI	USA	Cooper 2007. Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach	HM102286	1
COI	Vietnam	Cook 2010. <i>Bothaella manhi</i> , a new species of tribe Aedini (Diptera: Culicidae) from the Cuc Phuong National Park of Vietnam based on morphology and DNA sequence	HQ398900, HQ398901	2
COI	Madagascar	Raharimalala 2012 Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, <i>Aedes aegypti</i> and <i>Aedes albopictus</i> (Diptera, Culicidae), in Madagascar	JN406654-JN406658, JN406660-JN406732, JN406795-JN406797, JN406804-JN406809, JN406822-JN406826	92
COI	Isla Reunión	Raharimalala 2012 Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, <i>Aedes aegypti</i> and <i>Aedes albopictus</i> (Diptera, Culicidae), in Madagascar	JN406659	1
COI	Turquia	Otter , K, Alten B, Unpublished	JQ412504	1
COI	Japón	Xu and Fonseca 2011. One-way sequencing of multiple amplicons from tandem repetitive mitochondrial DNA control region	JQ004524	1
COI	USA	Xu and Fonseca 2011. One-way sequencing of multiple amplicons from tandem repetitive	JQ004525	1

		mitochondrial DNA control region		
COI	Libano	Haddad 2012 (<i>Aedes albopictus</i> in Lebanon a potential risk of arbovirus)	JX912500	1
COI	Pakistan	Ashfaq, M. 2014 (Analizing mosquito (Diptera:culicidae) diversity in Pakistan	KF406398-KF406400, KF406402-KF406407, KF406410-KF406412, KF406414, KF406415, KF406417, KF406419-KF406422, KF406425-KF406429, KF406432-KF406440, KF406442, KF406445, KF406447-KF406457, KF406460, KF406462, KF406463, KF406465, KF406466, KF406468-KF406513, KF406517-KF406520, KF406522-KF406526, KF406530-KF406535, KF406537-KF406541, KF406543-KF406547, KF406549-KF406553, KF406555-KF406579	152
COI	Costa Rica	Zhong, D., Lo, E., Hu, R. y cols. (2013). Genetic analysis of invasive <i>Ae. albopictus</i> populations in Los Angeles county , California and its potential public health impact. <i>PLoS ONE</i> ; 8(7): e68586.	KC690912-KC690914, KC690932-KC690945	17
	Panama	Zhong, D., Lo, E., Hu, R. y cols. (2013). Genetic analysis of invasive <i>Ae. albopictus</i> populations in Los Angeles county , California and its potential public health impact. <i>PLoS ONE</i> ; 8(7): e68586.	KC690932-KC690944	13
COI	Costa Rica	Futami 2015New and Common Haplotypes Shape Genetic Diversity in Asian TigerMosquito Populations from Costa Rica and Panama	AB907796-AB907800	5
	Panama	Futami 2015New and Common Haplotypes Shape Genetic Diversity in Asian TigerMosquito Populations from Costa Rica and Panama	AB907801	1
COI	Marruecos	Bennouma 2016First record of well-established <i>Aedes albopictus</i> (<i>Stegomyia albopicta</i>) populations (Diptera: Ceratopogonidae) in Morocco: a major threat to public health in Northern Africa. Unpublished	KU522419-KU522421	3
COI	Japón	Taira, K., Toma, T., 2012	AB738197	1

COI	Grecia	Giatsopoulos 2012. A study on distribution and seasonal abundance of <i>Aedes albopictus</i> (Diptera: Culicidae) population in Athens, Greece	JF810659	1
COI	Corea del sur	Lee, S., 2015 DNA barcoding of the main mosquito species in Korea	KT358457-KT358459	3
COI	India	Prem G 2014 Mitochondrial Cytochrome c Oxidase (COI) gene sequences of mosquitoes in India	KJ410333, KJ410335	2
COI	Holanda	Van de Vossenbergh 2015. Real-time PCR Tests in Dutch Exotic Mosquito Surveys; Implementation of <i>Aedes aegypti</i> and <i>Aedes albopictus</i> Identification Tests, and the Development of Tests for the Identification of <i>Aedes atropalpus</i> and <i>Aedes japonicus japonicus</i> (Diptera: Culicidae)	KM457528-KM457532, KM457535-KM457546, KM457548, KM457550, KM457553-KM457564	31
COI	Italia	Shaikevich, E.V. and Talbalaghi, A. 2012 Molecular characterization of the Asian tiger mosquito <i>Aedes albopictus</i> (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Northern Italy	JX679373-JX679386	14

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hormonas que regulan el desarrollo. Esquema del sistema nervioso. Modificado de Hartenstein, 2006.....	9
Figura 2. Pupas y larvas de <i>Ae. albopictus</i> ©Roger Eritja.....	10
Figura 3. Hemosucción de hembras de <i>Ae. albopictus</i> . ©Roger Eritja.....	11
Figura 4. Huevos de <i>Ae. albopictus</i> . A: detalle del cambio de coloración con el paso del tiempo. B: huevos ya endurecidos y oscurecidos ©Roger Eritja.....	13
Figura 5. Esquema de las fases de la diapausa del huevo de <i>Ae. albopictus</i> . Adaptado de Lacour 2016, a su vez modificado de Kostal, 2006.....	14
Figura 6. Distribución actual conocida de <i>Ae. albopictus</i> . En rojo región nativa, en azul distribución actual basada en referencias bibliográficas. Los puntos señalan la localización de la primera detección en cada país. Modificado de Aguirre-Obando y Navarro-Silva, 2017.....	19
Figura 7. Dispersión temporal de <i>Ae. albopictus</i> desde su zona originaria. Modificado de Manni y cols., 2017.....	20
Figura 8. Mapa de los países europeos en los que se realiza vigilancia de mosquitos exóticos. ECDC, 2017.....	23
Figura 9. Ciclo infeccioso de un vector. Modificado de Mellor y cols., 2000.....	24
Figura 10. Áreas de riesgo de transmisión de chikunguña. OMS, 2015.....	29
Figura 11. Áreas de riesgo de transmisión de dengue. OMS, 2014.....	30
Figura 12. Clasificación de las áreas por transmisión de Zika. ECDC, 2017.....	31
Figura 13. Áreas de riesgo de transmisión de Zika. Modificado de Gardner y cols., 2017.....	32
Figura 14. Métodos ya existentes y en desarrollo de control de mosquitos. Modificado de Achee y cols., 2015.....	44
Figura 15. Distribución conocida de <i>Ae. albopictus</i> en España 2004-2010.....	55
Figura 16. Mapa físico de España (Gifex, 2009).....	57
Figura 17. Municipios estudiados en este trabajo (azul) y municipios anteriormente detectados positivos en el periodo 2004-2010 (amarillo).....	59
Figura 18. Abundancia de huevos de <i>Ae. albopictus</i> por trampa y porcentaje de muestras positivas registradas a lo largo de los dos años de estudio (2015 y 2016) en Benicassim.....	64
Figura 19. Número de huevos de <i>Ae. albopictus</i> , contabilizados en el periodo de estudio 2015 y 2016 en una trampa de Los Montesinos.....	65
Figura 20. Número de huevos de <i>Ae. albopictus</i> , contabilizados en el periodo de estudio 2015 y 2016 en una trampa de la Era Alta.....	65
Figura 21. Abundancia de huevos de <i>Ae. albopictus</i> por trampa y porcentaje de muestras positivas registradas a lo largo de los dos años de estudio (2015 y 2016) en Cartagena.....	66

Figura 22. Abundancia de huevos de <i>Ae. albopictus</i> por trampa y porcentaje de muestras positivas registradas a lo largo de 2016 en Benalmádena	67
Figura 23. Abundancia de huevos de <i>Ae. albopictus</i> por trampa y porcentaje de muestras positivas registradas en 2016 en Alhaurín de la Torre	68
Figura 24. Abundancia de huevos de <i>Ae. albopictus</i> por trampa y porcentaje de muestras positivas registradas en 2016 en Torremolinos.....	69
Figura 25. Municipios detectados positivos y negativos en el periodo 2011-2016 (rojo/verde). Positivos anteriores a este trabajo, 2004-2010 (amarillo)	70
Figura 26. Municipios estudiados en este trabajo cada año en el periodo 2011-2016.....	71
Figura 27. Año de primera detección en municipios estudiados en este trabajo. Positivos anteriores a este trabajo, 2004-2010 (amarillo)	73
Figura 28. A. Positivos detectados y negativos en la Comunidad Valenciana; B. Año de primera detección en municipios de la Comunidad Valenciana estudiados en este trabajo (2011-2016). Positivos anteriores a este trabajo, 2004-2010 (amarillo)	75
Figura 29. A. Positivos detectados y negativos en las Islas Baleares; B. Año de primera detección en municipios baleares estudiados en este trabajo.....	77
Figura 30. A. Positivos detectados y negativos en la Región de Murcia; B. Año de primera detección en municipios murcianos estudiados en este trabajo	78
Figura 31. A. Positivos detectados y negativos en Andalucía; B. Año de primera detección en municipios andaluces estudiados en este trabajo.....	80
Figura 32. Positivos detectados y negativos en el País Vasco.....	82
Figura 33. A. Positivos detectados y negativos en Aragón; B. Año de primera detección en municipios aragoneses estudiados en este trabajo.....	83
Figura 34. Municipios detectados positivos hasta 2016 (excepto Cataluña). Anteriores a este trabajo, 2004-2010 (amarillo). En el periodo de realización de este trabajo: Positivos detectados en muestreos coordinados o en relación al proyecto del ministerio (rojo) y primeros positivos detectados por otros investigadores o entidades (azul).	86
Figura 35. Geolocalización de las muestras de mosquitos analizadas genéticamente	98
Figura 36. Red de haplotipos para el gen COI.....	103
Figura 37. Red de haplotipos del gen ITS2.....	105
Figura 38. Resultado del análisis de desajuste (mismatch) basado en dos modelos distintos de cambios bruscos en el tamaño poblacional, un cambio rápido en el tiempo (A y C) o un cambio en el espacio (B y D) para los fragmentos de los genes COI (A, B) y ITS2 (C, D)	107
Figura 39. Ciclo de vida de hongos entomopatógenos del orden Hypocreales. Modificado de Boomsma y cols., 2014	120

Figura 40. Morfología macroscópica (A) y microscópica (B) de <i>M. anisopliae</i> Pik-Kheng y cols., 2009.....	121
Figura 41. Morfología macroscópica (A: Echeverría, 2006) y microscópica (B: Luque, 2011) de <i>B. bassiana</i>	122
Figura 42. Estructura y composición de la cutícula de insectos y forma de penetración de hongos entomopatógenos” Modificado de Vega y cols., 2012.	123
Figura 43. A: Torre de Potter. B: Zona de pulverización sobre la placa Petri...	128
Figura 44. Detalle de la pulverización sobre los mosquitos	129
Figura 45. Detalle de <i>M. anisopliae</i> sobre una hembra de <i>Ae. albopictus</i>	129
Figura 46. Detalle de <i>B. bassiana</i> sobre una hembra de <i>Ae. albopictus</i>	130
Figura 47. Eclosionadores con las hembras tratadas aisladas en su interior	131
Figura 48. Supervivencia acumulada de los mosquitos en función del tipo de tratamiento recibido. A. alimentados con azúcar; B. alimentados con sangre .	132
Figura 49. Tiempo en días en el que se produce la muerte de los mosquitos tras recibir los tratamientos A. alimentados con azúcar B. alimentados con sangre. Los valores atípicos del grupo control están marcados con asteriscos y con círculos en el resto de tratamientos	134
Figura 50. Número de huevos ovipositados tras recibir los distintos tratamientos	136
Figura 51. Emergencia de adultos (%) a partir de huevos procedentes de hembras tratadas.....	137

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Virus aislados en <i>Ae. albopictus</i> así como su competencia para la transmisión. ICTV, 2017	28
Tabla 2. Total de municipios muestreados a lo largo del periodo de estudio. En rojo, aquellos muestreos derivados de la aplicación de ciencia ciudadana “Atrapaeltigre”, actualmente “MosquitoAlert”	62
Tabla 3. Resultados por años de los municipios estudiados y los positivos en cada Comunidad Autónoma	72
Tabla 4. Datos de municipios y puntos totales muestreados a lo largo del periodo de estudio en la Comunidad Valenciana	75
Tabla 5. Datos de número de trampas y municipios estudiados en cada provincia durante el periodo de trabajo en la Comunidad Valenciana	76
Tabla 6. Datos de municipios y puntos totales muestreados a lo largo del periodo de estudio en las Islas Baleares	78
Tabla 7. Datos de número de trampas y municipios estudiados en cada provincia durante el periodo de trabajo en las Islas Baleares	78
Tabla 8. Datos de municipios y puntos totales muestreados a lo largo del periodo de estudio en la Región de Murcia	79
Tabla 9. Datos de número de trampas y municipios estudiados durante el periodo de trabajo en la Región de Murcia	80
Tabla 10. Datos de municipios y puntos totales muestreados a lo largo del periodo de estudio en Andalucía	81
Tabla 11. Datos de número de trampas y municipios estudiados en cada provincia durante el periodo de trabajo en Andalucía	82
Tabla 12. Datos de municipios y puntos totales muestreados a lo largo del periodo de estudio en el País Vasco	82
Tabla 13. Datos de número de trampas y municipios estudiados en cada provincia durante el periodo de trabajo en el País Vasco	83
Tabla 14. Datos de municipios y puntos totales muestreados a lo largo del periodo de estudio en Aragón	83
Tabla 15. Datos de número de trampas y municipios estudiados en cada provincia durante el periodo de trabajo en Aragón	83
Tabla 16. Programación detallada de la PCR para los cebadores utilizados	100
Tabla 17. Resultados estadísticos de la diversidad genética encontrada en el gen COI	104
Tabla 18. Resultados estadísticos de la diversidad genética encontrada en el gen ITS2	106
Tabla 19. Resultados de SAMOVA con el gen ITS2	109
Tabla 20. Aislados de las especies de hongo empleadas para los estudios	127

Tabla 21. Mortalidad total (%) y supervivencia (media \pm ES) calculada en base diaria a continuación de la exposición de los mosquitos (con distinto régimen alimenticio) a los distintos aislados de <i>M. anisopliae</i> y <i>B. bassiana</i>	133
Tabla 22. Medianas de la supervivencia calculada en base diaria a continuación de la exposición de los mosquitos (con distinto régimen alimenticio) a los distintos aislados de <i>M. anisopliae</i> y <i>B. bassiana</i> . El valor entre paréntesis corresponde con los intervalos de confianza al 95%.....	135
Tabla 23. Tiempo letal 50 y 90 (en días) de los diferentes aislados de hongos testados frente a adultos de <i>Ae. albopictus</i> con distinto régimen alimenticio....	135
Tabla 24. Resultados de fecundidad de las hembras tras los tratamientos	137
Tabla 25. Porcentaje de eclosión de adultos respecto del n° total de huevos ovipositados por hembras tratadas	138

