



# **Eficacia protectora de dos vacunas frente a la infección experimental de perdiz roja (*Alectoris rufa*) con el virus West Nile**

Trabajo Fin de Máster realizado por

**Virginia Gamino Rodríguez**

Vº Bº de la Directora

**Ursula Höfle**

Máster Universitario en Investigación Básica y Aplicada en Recursos Cinegéticos

Tema: Enfermedades de las aves silvestres

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN RECURSOS CINEGÉTICOS (CSIC-UCLM-JCCM)

UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>2</b>
<b>2. Material y métodos</b> .....	<b>7</b>
2.1. Animales del estudio.....	7
2.2. Vacunas testadas .....	7
2.3. Inóculo del virus .....	7
2.4. Diseño experimental .....	7
2.5. Toma de muestras .....	8
2.6. Titulación del virus .....	10
2.7. Serología.....	10
2.8. Detección el genoma del virus en tejidos .....	10
2.9. Histología e inmunohistoquímica .....	10
2.10. Análisis estadístico .....	11
<b>3. Resultados</b> .....	<b>12</b>
3.1. Morbilidad y mortalidad .....	12
3.2. Viremia .....	12
3.3. Respuesta inmune humoral.....	12
3.4. Lesiones macroscópicas.....	13
3.5. Detección del virus en tejidos.....	14
3.6. Lesiones microscópicas .....	14
3.7. Inmunohistoquímica .....	17
<b>4. Discusión</b> .....	<b>20</b>
<b>5. Conclusión</b> .....	<b>23</b>
<b>6. Bibliografía</b> .....	<b>24</b>

# Eficacia protectora de dos vacunas frente a la infección experimental de perdiz roja (*Alectoris rufa*) con el virus West Nile

## Resumen

El virus West Nile (WNV) es un agente zoonótico de distribución mundial que se mantiene en la naturaleza en un ciclo enzoótico en el que participan aves silvestres y mosquitos. Bajo ciertas circunstancias este virus es capaz de infectar a hospedadores accidentales como el hombre o los caballos, pudiendo provocar su muerte. A pesar de las ventajas que podría tener proteger a las aves frente a la infección por WNV, no sólo para reducir la mortalidad, sino para interrumpir el ciclo de transmisión, no existen vacunas con licencia para su uso en éstas. En el presente trabajo estudiamos la eficacia protectora de dos vacunas, una elaborada a partir de la proteína E recombinante (rE) de WNV y otra inactivada que es comercializada para su uso en caballos, frente a la infección experimental con WNV en perdiz roja (*Alectoris rufa*). El estudio se llevó a cabo con 46 pollos distribuidos en tres grupos de inmunización a los que se les inyectó, respectivamente, la rE, la vacuna inactivada o PBS a nivel intramuscular tres veces a intervalos de dos semanas. Tras la inmunización, las perdices fueron inoculadas a nivel subcutáneo con WNV. Se realizó una observación diaria de las aves y se tomaron muestras de sangre y tejidos en diferentes días experimentales. La rE indujo la producción de anticuerpos y redujo de manera significativa la morbilidad, mortalidad y el nivel de viremia. Por el contrario, la vacuna inactivada no fue capaz de inducir la producción de anticuerpos antes de la infección experimental ni de reducir de manera significativa la morbilidad o la mortalidad asociada a la infección. Ninguna de las vacunas evitó en el 100% de las perdices el desarrollo de lesiones o la presencia de virus en tejidos. Se necesitan más estudios para determinar si estas vacunas podrían ser candidatos comerciales para la protección de aves frente a la infección por WNV.

**Palabras clave:** aves, eficacia protectora, infección experimental, perdiz roja, vacunación, virus West Nile.

## 1. Introducción

El virus West Nile (WNV) es uno de los arbovirus zoonóticos más distribuidos del mundo con capacidad para infectar una gran variedad de especies, constituyendo las aves silvestres su principal reservorio (McLean y Ubico, 2007).

Este virus pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* y ha sido serológicamente clasificado dentro del complejo antigénico de la encefalitis japonesa, donde se encuadran otros virus como el de la encefalitis japonesa, encefalitis de San Louis o el virus Usutu (Calisher et al., 1989).

Los flavivirus son pequeños (50 nm de diámetro) virus de morfología redondeada conformados por una nucleocápside de simetría poliédrica rodeada por una envoltura lipídica (Lindenbach y Rice, 2003). Su genoma consiste en una cadena simple de ARN de polaridad positiva (11 kb de longitud) que configura tres proteínas estructurales (cápside (C), premembrana/membrana (prM/M) y envoltura (E)) y siete no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5) que juegan un papel importante en la patogenia de la infección (Brinton, 2002; Lindenbach y Rice, 2003). La proteína E es la más importante de las proteínas de la superficie del virus y está organizada en tres dominios estructurales (DI, DII, DIII) (Lindenbach y Rice, 2003). Esta proteína participa en la unión a los receptores y la fusión con la membrana de las células del hospedador y constituye (fundamentalmente el DIII) el principal determinante antigénico frente al cual se desarrollan los anticuerpos neutralizantes del hospedador (Lindenbach y Rice, 2003; Martín-Acebes y Saiz, 2012).

Los aislados de WNV han sido clasificados filogenéticamente en 7 linajes, siendo los linajes 1 y 2 los más importantes (Mackenzie y Williams, 2009). El linaje 1 contiene las cepas consideradas más virulentas y está ampliamente distribuido por Europa, América, Oriente Medio, India, África y Australia (Lanciotti et al., 2002). El linaje 2 estaba conformado por cepas que sólo circulaban en el sur de África y Madagascar pero recientemente ha sido detectado en Europa, donde ha dado lugar a casos de encefalitis grave en humanos, aves y caballos (Bakonyi et al., 2006; Bagnarelli et al., 2011; Kutasi et al., 2011).

WNV es mantenido en la naturaleza en un ciclo enzoótico en el que participan mosquitos ornitófilos y aves (Gaunt et al., 2001). Las aves migratorias juegan un papel importante en la dispersión local y a larga distancia de WNV (Malkinson y Banet, 2002; Peterson et al., 2003). Algunas especies del orden Passeriformes como el mirlo americano (*Turdus migratorius*) y el gorrión común (*Passer domesticus*) son los principales reservorios de este flavivirus en Norteamérica y Europa (Langevin et al., 2005; Kilpatrick et al., 2006).

Cuando la circulación de WNV es muy intensa, éste puede infectar a otros vertebrados como algunos anfibios, reptiles y mamíferos, resultando especialmente patógeno para los équidos y el hombre. No obstante, la mayoría de estos individuos son considerados como hospedadores accidentales o “fondo de saco”, ya que no desarrollan suficiente viremia ( $\geq 10^5$  UFP/ml) para infectar a mosquitos (Turell et al., 2001; van der Meulen et al., 2005; Kramer et al., 2008). En Europa, los principales vectores de WNV son *Culex pipiens*, *Cx. modestus* y *Coquillettidia richiardii* (Hubálek y Halouzka, 1999). Otras vías de transmisión que han sido demostradas en aves son el consumo de presas infectadas o agua contaminada y el contacto con individuos infectados (Banet-Noach et al., 2003; Komar et al., 2003; Nemeth et al., 2006).

En áreas endémicas, la infección en aves suele tener lugar en primavera y a principios de verano, apareciendo los picos de mortalidad desde mitad del verano hasta principios de otoño. Los casos en humanos y en caballos, si existen, suelen producirse algunas semanas después del inicio de la mortalidad en aves (Phalen y Dahlhausen, 2004).

WNV fue aislado por primera vez de la sangre de una mujer con un proceso febril en Uganda en 1937 (Smithburn et al., 1940). Antes de la década de los 90, a pesar de que era uno de los flavivirus más distribuidos en humanos, aves y mosquitos de África, Oriente Medio y el suroeste de Europa, sólo ocasionalmente daba lugar a infecciones que generalmente eran subclínicas o poco importantes y que afectaban sobre todo a humanos y caballos (Hubálek y Halouzka, 1999; Murgue et al., 2002). Sin embargo, a partir de los años 90 la frecuencia y gravedad de las infecciones en humanos incrementó, así como el número de casos en otros vertebrados, incluyendo animales de compañía, de granja y silvestres (van der Meulen et al., 2005). En el año 1999 WNV fue introducido en Norteamérica (Nash et al., 2001; Ludwig et al., 2002) y desde entonces se han diagnosticado miles de casos de encefalitis en humanos, caballos y aves asociados a la infección por este flavivirus (CDCa). Hoy en día WNV es considerado endémico tanto en Europa como en Norteamérica (De Filette et al., 2012; Jiménez-Clavero, 2012).

La susceptibilidad de las aves a la infección con WNV varía en función de la especie, por lo que no todas llegan a sufrir un proceso clínico (Gamino y Höfle, 2013). En Europa, WNV ha sido aislado de numerosas aves residentes y migratorias, acuáticas y terrestres, pero los casos de mortalidad han sido esporádicos, afectando fundamentalmente a aves rapaces (Bakonyi et al., 2006; Jiménez-Clavero et al., 2008; Wodak et al., 2011). Por el contrario, en Norteamérica existen más de 300 especies de aves susceptibles (CDCb), siendo las aves de la

familia *Corvidae* del orden Passeriformes las más susceptibles a la infección (Komar et al., 2003; LaDeau et al., 2007; Foppa et al., 2011).

La patogenia de la infección por WNV suele seguir el mismo esquema en las diferentes especies de aves (Gamino y Höfle, 2013). Una vez el virus es inoculado por el mosquito, se produce una replicación inicial en el punto de inoculación (Lim et al., 2011) tras lo cual WNV es rápidamente distribuido a los diferentes órganos del hospedador (Nemeth et al., 2011). El virus puede detectarse en sangre desde el día 1 hasta el día 10 post infección y el pico de viremia se suele dar entre los días 3 y 4 (Gamino y Höfle, 2013). La presencia de WNV en el hospedador activará una respuesta inmune innata que, al menos en mamíferos, incluye la producción de interferón, la activación del sistema de complemento y la actuación de algunas células como los macrófagos o las células NK entre otras (Chambers y Diamond, 2003; Samuel y Diamond, 2006).

WNV tiene un amplio tropismo celular y tisular. El bazo suele ser el primer órgano en el que el virus es detectado, tras lo cual pasa a detectarse en el pulmón, el hígado, el corazón y el riñón, llegando de forma más tardía al sistema nervioso central (SNC) (Gamino y Höfle, 2013). La presencia de infiltrados inflamatorios mononucleares, hemorragias y degeneración y necrosis celular en estos órganos es característica en la infección por WNV (Steele et al., 2000; Gamino y Höfle, 2013). Ante la infección sistémica el hospedador desarrolla una respuesta inmune adaptativa en la que participan linfocitos T CD4+ y CD8+ y linfocitos B. Los linfocitos B producen anticuerpos neutralizantes frente a la proteína E y, en menor medida, frente a la prM del flavivirus, pero también anticuerpos no neutralizantes frente a la proteína NS1 (Chambers y Diamond, 2003; Samuel y Diamond, 2006; Suthar et al., 2013). En la mayoría de especies de aves, la seroconversión se detecta entre los días 4 y 6 post infección (Weingartl et al., 2004; Sotelo et al., 2011). Los anticuerpos neutralizantes pueden persistir más de un año, protegen frente a la reinfección por el virus y pueden ser transferidos a la prole (Gibbs et al., 2005; Hahn et al., 2006; Nemeth et al., 2008, 2009). En caso de que las defensas del hospedador no consigan frenar la replicación del virus en órganos como el corazón, bazo, hígado o riñón aparecerán signos clínicos inespecíficos como depresión, anorexia, deshidratación o erizamiento de plumas, pero también derivados de la infección del SNC como ataxia, postura o movimientos anormales de la cabeza, convulsiones, desorientación o incapacidad para volar entre otros (Steele et al., 2000; Fitzgerald et al., 2003; Wünschmann et al., 2004). Estos signos pueden observarse a los 5 días post infección y la muerte suele darse entre las 24 y 72 horas posteriores a la aparición de los mismos (Komar et al., 2003; Wünschmann y Ziegler, 2006; Sotelo et al., 2011).

El interés por desarrollar una vacuna para proteger frente a la infección por este flavivirus dentro de la medicina veterinaria surgió como consecuencia de las grandes pérdidas económicas que supuso para la industria ecuestre en Norteamérica (Monath, 2001). Actualmente, existen tres vacunas con licencia del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA) para su uso en caballos (Tabla 1) y muchas otras de las que está siendo probada su eficacia protectora (De Filette et al., 2012; Brandler y Tangy, 2013; Iyer y Kousoulas, 2013). Por el contrario, a pesar de que WNV también ha causado un elevado número de muertes en humanos en Norteamérica (CDCa), no existen vacunas con licencia de los organismos pertinentes para su uso en la población. No obstante, diferentes candidatos han sido testados en animales de experimentación y están siendo sometidos a ensayos clínicos (De Filette et al., 2012; Brandler y Tangy, 2013). Algunos autores han indicado que la vacunación de aves presenta grandes ventajas frente a la vacunación de personas, entre otras causas debido a la elevada relación coste-beneficio que supone el desarrollo de vacunas para la población humana y la incertidumbre de la importancia clínica que tendrá la encefalitis causada por WNV en un futuro (Monath, 2001; Kilpatrick et al., 2010). Sin embargo, todavía no existen vacunas con licencia para su uso en aves. No obstante, se están realizando numerosos estudios experimentales en los que se están obteniendo resultados muy variables en función de la especie vacunada, la cepa de WNV infectante, el tipo de vacuna o la metodología de inmunización entre otros aspectos (Malkinson et al., 2001; Bertelsen et al., 2004; Chang et al., 2007; Jarvi et al., 2008; Fassbinder-Orth et al., 2009; Boyce et al., 2011; Redig et al., 2011; Wheeler et al., 2011). La vacunación de aves tiene interés no sólo para tratar de interrumpir el ciclo de transmisión del virus sino también para proteger a especies de alto valor económico o en peligro de extinción (Monath, 2001; Okeson et al., 2007; Kilpatrick et al., 2010; Young y Jefferies, 2013). Algunos de los parámetros que se han utilizado para determinar la eficacia de estas vacunas son la capacidad de prevención o de reducción de la enfermedad clínica, la inducción de anticuerpos frente al virus, la reducción del nivel de viremia o de individuos con virus en sangre, y la reducción en la severidad de las lesiones o la cantidad de virus detectado en diferentes órganos del hospedador (Turell et al., 2003; Sá E. Silva et al., 2013).

**Tabla 1.** Vacunas con licencia del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA) y comercializadas para la protección de caballos frente a la infección por el virus West Nile (WNV).

Tipo de vacuna	Nombre comercial	Laboratorio	Antígeno	Referencia
Inactivada	Duvaxyn/Innovator	Pfizer/Zoetis	Virus entero inactivado	(Ng et al., 2003)
Inactivada	Vetera	Boehringer Ingelheim	Virus entero inactivado	
Virus recombinante	RecombiTEK	Merial	Proteínas E y prM de WNV expresadas en poxvirus de canario	(Minke et al., 2004)

En España está autorizado el uso en caballos de la vacuna inactivada comercializada bajo el nombre de Duvaxyn<sup>®</sup>WNV (Pfizer, Alcobendas, España). Esta vacuna comenzó a utilizarse fundamentalmente a partir del año 2010, cuando se diagnosticaron los primeros casos de encefalitis y mortalidad en caballos del sur de nuestro país, los cuales se han seguido repitiendo en los años siguientes (García-Bocanegra et al., 2011, 2012; RASVE, 2013).

Aunque en España la circulación de WNV y la presencia de anticuerpos frente al mismo en aves se conoce desde hace mucho tiempo (Figuerola et al., 2007, 2008; Höfle et al., 2008; López et al., 2008), los únicos casos de encefalitis y mortalidad diagnosticados hasta la fecha se produjeron en el año 2007 en dos águilas reales (*Aquila chrysaetos*) y un águila perdicera (*Aquila fasciata*) (Jiménez-Clavero et al., 2008). No obstante, la perdiz roja (*Alectoris rufa*), una especie mediterránea endémica de alto valor socioeconómico y ecológico en la Península Ibérica (Blanco-Aguiar et al., 2003), demostró ser susceptible a la infección experimental con dos cepas mediterráneas de WNV, desarrollando signos clínicos y una mortalidad de hasta el 70% (Sotelo et al., 2011). Aunque no se ha diagnosticado ningún caso de mortalidad en perdiz roja asociado a la infección natural por WNV, en el año 2010 se produjo en el sur de España un brote de elevada mortalidad causado por el virus Bagaza (BAGV), un flavivirus muy similar a WNV (Gamino et al., 2012a).

Teniendo en cuenta que en España la perdiz roja es producida en granjas cinegéticas de manera intensiva para repoblación (Aebischer y Potts, 1994), que en estas granjas una parte de la producción se realiza al aire libre (pudiendo contactar las aves con mosquitos infectados), que la perdiz desarrolla una viremia suficiente como para poder ser considerada reservorio de WNV (Sotelo et al., 2011) y que supone un recurso trófico para otras especies, alguna de ellas amenazadas (Blanco-Aguiar, 2007), esta especie constituye un buen candidato para estudios de eficacia vacunal frente a la infección por WNV.

En el presente trabajo, por tanto, determinamos la eficacia protectora que tienen una vacuna elaborada a partir de la proteína E recombinante de WNV y la vacuna comercial



Duvaxyn<sup>®</sup>WNV frente a la infección experimental con una cepa norteamericana de WNV en perdiz roja.

## **2. Material y métodos**

### 2.1. Animales del estudio

El estudio se llevó a cabo con 46 pollos de perdiz roja procedentes de una granja cinegética. Éstos fueron mantenidos, hasta el momento de ser trasladados para la infección experimental, en unas instalaciones de las que dispone la Universidad de Castilla-La Mancha (finca Dehesa Galiana), donde se les proporcionó agua y pienso *ad libitum*.

### 2.2. Vacunas testadas

Se estudió la eficacia protectora de dos vacunas. Una de ellas fue elaborada a partir de la proteína E recombinante (rE) de la cepa 382-99 de WNV, siguiendo el protocolo descrito en Alonso-Padilla y cols. (2010). De forma resumida, la proteína E fue clonada y expresada en baculovirus, inoculada en larvas de insecto (*Trichoplusia ni lepidopter*, *T. ni*) y, finalmente, extraída (72 horas post inoculación) y purificada. Por otro lado, se determinó la eficacia protectora de la vacuna comercializada por los laboratorios Pfizer bajo el nombre de Duvaxyn<sup>®</sup>WNV (DV), elaborada a partir de virus completo inactivado y adyuvantada con MetaStim<sup>®</sup>.

### 2.3. Inóculo del virus

Para comprobar la eficacia protectora de las vacunas anteriormente citadas, las perdices fueron inoculadas con una cepa de WNV aislada de un flamenco infectado en Nueva York en el año 1999 (cepa WNV-NY99 382-99, número de acceso GenBank AF196835NY99), la cual fue propagada y titulada en células Vero (Córdoba et al., 2007).

### 2.4. Diseño experimental

A las tres semanas de edad, las perdices fueron distribuidas en tres grupos de inmunización. Uno de ellos estuvo conformado por 20 perdices a las que se les inyectó, en dos puntos de la musculatura pectoral (0,1 ml/punto), una dosis total de 10 µg/individuo de la rE diluida en PBS y mezclada a una proporción 1:1 con un adyuvante de tipo emulsión agua en aceite (Stimune, Prionics AG, Schlieren-Zurich, Suiza). El segundo grupo estuvo conformado por 13 perdices a las que se les inyectó en dos puntos de la musculatura pectoral (0,1 ml/punto) la vacuna DV. Finalmente, el tercer grupo estuvo conformado por 13 perdices que constituyeron el grupo control y a las que se les inyectó de igual forma PBS. Estas perdices fueron

revacunadas o reinyectadas con PBS a las cinco y siete semanas de edad (Tabla 2). Una semana después de la última inyección, las perdices fueron trasladadas a instalaciones de nivel de bioseguridad 3 (BSL-3) pertenecientes al Instituto de Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), donde fueron separadas en jaulas por grupo de inmunización. Tras una semana de aclimatación, a las nueve semanas de edad (dos semanas tras la última inmunización), las perdices fueron inoculadas vía subcutánea a nivel cervical, con una dosis de  $10^7$  Unidades Formadoras de Placa (UFP) de la cepa WNV NY99 diluida en 0,1 ml de Medio Esencial de Dulbecco Modificado (DMEM) (Tabla 2). Se llevó a cabo una observación diaria de los individuos en estudio con la finalidad de detectar signos clínicos o mortalidad. Todos los animales fueron manejados siguiendo de manera estricta las directrices de la Comunidad Europea 86/609/CEE y los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética de experimentación animal del INIA (número de permiso 2010-015). A las perdices se les proporcionó agua y comida *ad libitum* durante todo el experimento.

#### 2.5. Toma de muestras

Se tomaron muestras de sangre de la vena braquial con jeringas heparinizadas una semana antes de la primera inyección de vacuna/PBS (muestra pre-inmunización), una semana después de cada inmunización y a los días 3, 7, 10 y 14 post inoculación del virus (dpi) (Tabla 2). Además, se realizó la eutanasia de uno o dos animales de cada grupo los días 3, 7, 10 y 14 pi (Tabla 2) mediante anestesia inhalatoria con Isoflurano (Isoba<sup>®</sup>vet, Schering-Plough, Middlesex, Reino Unido) e inyección intravenosa de T61<sup>®</sup> (Embutramida, Mebezonio yoduro, Tetracaína clorhidrato) (Intervet, Salamanca, España) a una dosis de 0,2-2 ml/animal.

En la necropsia tanto de los individuos eutanasiados (n = 18) como de los encontrados muertos (n = 3), se tomaron muestras de encéfalo, corazón, hígado, bazo y riñón que fueron guardadas en tubos estériles a -70°C para su posterior análisis. Además, se tomaron muestras de encéfalo (cerebro, cerebelo, lóbulo óptico, puente y médula oblongada), timo, pulmón, corazón, hígado, bazo, páncreas, tonsilas cecales, bolsa de Fabricio, medula espinal, riñón, glándula adrenal, testículo, ovario, músculo pectoral y piel con folículos de pluma. Éstas fueron fijadas en formol tamponado al 10% para su posterior procesado.

**Tabla 2.** Organización del experimento para determinar la eficacia protectora de la proteína E recombinante de WNV y de la vacuna comercial Duvoxyn®WNV frente a la infección experimental de perdiz roja con WNV.

Día experimental	0	7	14	21	28	35	42	45	49	52	56
Día post inoculación de WNV	-42	-35	-28	-21	-14	-7	0	3	7	10	14
Muestra	Sangre	Sangre	-	Sangre	-	Sangre	-	Sangre, tejidos	Sangre, tejidos	Sangre, tejidos	Sangre, tejidos
Procedimiento	1ª inmunización	-	2ª inmunización	-	3ª inmunización	Traslado a BSL-3	Inoculación WNV NY99 (10 <sup>7</sup> UFP/individuo)	Necropsia	Necropsia	Necropsia	Necropsia
Edad de las perdices	3 semanas	5 semanas	7 semanas	9 semanas	11 semanas						



**Final del experimento**

## 2.6. Titulación del virus

Las muestras de sangre tomadas a 3 y 7 dpi fueron analizadas para determinar la presencia y la concentración de WNV mediante inoculación en células Vero. Tras la centrifugación de las muestras, el plasma fue diluido de forma seriada 10 veces y adsorbido en células Vero cultivadas en placas de seis pocillos. Tras la eliminación del inóculo, se permitió que la infección de las células continuase en un medio semisólido. Finalmente, a las 72 horas post inoculación, las placas infectadas se fijaron con formaldehído al 4%, se eliminó el medio semisólido y las placas fueron teñidas y visualizadas (Martín-AceEbelbes et al., 2011).

## 2.7. Serología

La detección de Inmunoglobulina G (IgG) frente a WNV en las muestras de sangre pre-inmunización y en las tomadas después de cada inmunización y a 3, 7, 10 y 14 dpi se realizó mediante un Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) según lo descrito en Ebel y cols. (2002), utilizando WNV inactivado por calor como antígeno (Blitvich et al., 2003). Se consideró como muestra positiva toda aquella en la que la división de su absorbancia (P) entre la absorbancia de la muestra control negativa (N) dio un valor igual o mayor a dos ( $P/N \geq 2$ ).

## 2.8. Detección del genoma del virus en tejidos

El material genético del virus fue extraído de los tejidos de las perdicas usando un kit comercial (Speedtools RNA virus extraction kit, Biotools B&M Labs S.A, Madrid, España) y cuantificado mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa – Transcripción Inversa (RT-PCR) en tiempo real según lo descrito en Lanciotti y cols. (2000). Para realizar dicha cuantificación se estableció una curva patrón a partir de virus previamente titulado ( $10^6$ – $10^{-1}$  UFP). Las muestras se consideraron negativas cuando el ciclo umbral fue mayor o igual a 35 ( $Ct \geq 35$ ), equivalente a  $10^2$  UFP/muestra.

## 2.9. Histología e inmunohistoquímica

Los tejidos fijados en formol fueron tallados, incluidos en parafina y procesados para obtener cortes histológicos de 4 $\mu$ m de grosor. Estos cortes fueron, por un lado, teñidos con hematoxilina y eosina (HE) y examinados por dos investigadores diferentes para determinar la presencia de lesiones. Cuando se detectaron lesiones se realizó una gradación de las mismas en base a su distribución en el tejido y la severidad de las mismas en una escala del 0 al 3 (Tabla 3). Por otro lado, se montaron los cortes en portaobjetos tratados con Vectabond™ (Vector Laboratories, Inc., Burlingame (CA), EEUU) con el fin de detectar la presencia de antígeno de WNV en los diferentes tejidos mediante inmunohistoquímica (IHQ). Para ello se

utilizó un anticuerpo primario policlonal de conejo (Producto 81-015, BioReliance, Rockville (MD), EEUU) y se siguió el protocolo descrito en Gamino y cols. (2012a). De forma resumida, las muestras fueron incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% diluido en metanol durante 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Después, se pre-trataron con proteinasa K (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) durante 7 minutos a temperatura ambiente. Las uniones inespecíficas del anticuerpo primario fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania) diluida al 2% en TBS (0,05 M, pH 7,5) con Tween20 (Sigma-Aldrich) al 0,1%. El anticuerpo primario fue diluido 1:1000 en BSA 2%-TBS-Tween 0,1% e incubado con la muestra toda la noche a 4°C. Una IgG de cabra anti-conejo biotinilada (Vector Laboratories) diluida 1:200 en TBS-Tween 0,1% fue utilizada como anticuerpo secundario e incubada una hora a temperatura ambiente con la muestra. Tras la incubación con un complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vector Laboratories) durante 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción colorimétrica se llevó a cabo durante un minuto con 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories). Como control positivo se usaron cortes histológicos de tejidos procedentes de una perdiz roja en la que la infección por WNV había sido demostrada por RT-PCR. Los controles negativos incluyeron la sustitución del anticuerpo primario por BSA al 2% y un suero negativo de conejo (Producto 81-015, BioReliance) así como el uso de tejidos de perdiz roja negativos en la RT-PCR. La tinción de antígeno se valoró en base a su distribución en el tejido y el porcentaje de células teñidas en una escala del 0 al 3 (Tabla 3).

#### 2.10. Análisis estadístico

La tasa de morbilidad y mortalidad así como la proporción de individuos con virus en sangre o con anticuerpos a cada día experimental fueron comparadas entre grupos mediante la prueba de Chi cuadrado ( $X^2$ ) (corrección de Fisher para tamaños muestrales pequeños). El título medio de viremia a 3 dpi se comparó ente el grupo control y el vacunado con la rE mediante la prueba de Mann-Whitney. Los niveles medios de anticuerpos en plasma después de cada inmunización en los individuos vacunados con la rE fueron comparados mediante análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, realizando comparaciones múltiples posteriores mediante pruebas post hoc. Finalmente, los niveles medios de anticuerpos en plasma en los días 3, 7, 10 y 14 tras la inoculación de WNV fueron comparados entre los tres grupos de inmunización mediante ANOVA con medidas repetidas, tras lo cual se realizaron comparaciones múltiples de los efectos intra e inter-sujetos. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando

el nivel de significación ( $p$ ) fue menor de 0,05 ( $p < 0,05$ ). Estos análisis se llevaron a cabo mediante el programa de análisis estadístico IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> Statistics versión 20 (IBM Corp.).

### 3. Resultados

#### 3.1. Morbilidad y mortalidad

Mientras que tres perdices del grupo control (33,3%) mostraron debilidad, depresión, postración y plumas erizadas 24 horas antes de ser encontradas muertas los días 2, 7 y 8 pi, ninguna de las perdices vacunadas con la rE mostró signos o fue encontrada muerta durante el experimento, por lo que la morbilidad y la mortalidad difirieron de forma estadísticamente significativa entre estos dos grupos ( $X^2 = 5,7$ ,  $gl = 1$ ,  $p < 0,05$ ). Una de las perdices vacunadas con DV (9%) fue encontrada con signos de depresión y plumas erizadas a 2 dpi y eutanasiada a 3 dpi al ser encontrada en decúbito lateral, por lo que consideramos a este individuo como un caso de mortalidad asociado a la infección por WNV y, por ello, esta vacuna no redujo la morbilidad o la mortalidad de manera significativa ( $p > 0,05$ ).

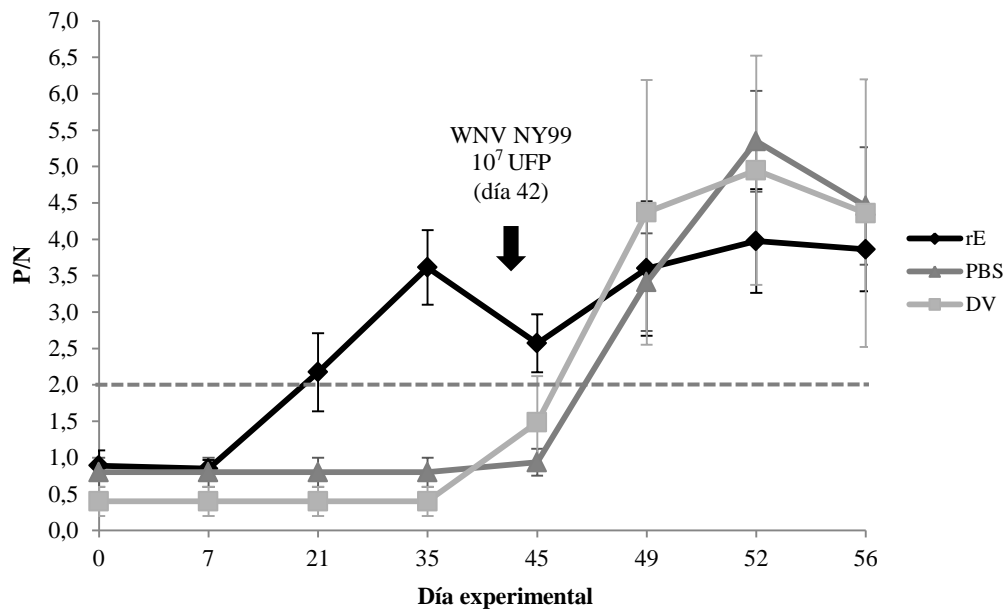
#### 3.2. Viremia

A 3 dpi, 11 de las 12 perdices control muestreadas (91,7%) mostraron viremia. El título medio fue  $1,2 \times 10^4$  UFP/ml plasma (rango entre  $2,4 \times 10^1$  y  $9,6 \times 10^4$ ), siendo significativamente mayor en las perdices encontradas muertas (media de  $5,8 \times 10^4$  UFP/ml) que en las eutanasiadas (media de  $1,9 \times 10^3$  UFP/ml) ( $Z = -4,1$ ,  $p < 0,05$ ). Por el contrario, sólo cuatro de las 20 perdices vacunadas con la rE (20%) mostraron viremia ( $X^2 = 15,5$ ,  $gl = 1$ ,  $p < 0,05$ ), cuyo nivel medio fue más bajo que en las perdices control ( $5 \times 10^2$  UFP/ml plasma, rango entre  $1,6 \times 10^1$  y  $1 \times 10^3$ ) ( $Z = -2,1$ ,  $p < 0,05$ ). A 7 dpi no se detectó virus en plasma en ningún individuo muestreado, vacunado o no. No se determinó la viremia en los individuos vacunados con DV.

#### 3.3. Respuesta inmune humoral

Ninguna de las perdices mostró anticuerpos (IgG) frente a WNV antes de la primera inmunización (Figura 1). Mientras que las perdices control y las vacunadas con DV no desarrollaron anticuerpos detectables por el ELISA hasta después de la infección con WNV, un 70% de las perdices vacunadas con la rE desarrollaron anticuerpos tras la segunda inmunización ( $X^2 = 10,8$ ,  $gl = 1$ ,  $p < 0,05$ ), cuyo nivel medio fue significativamente mayor después de la tercera dosis vacunal ( $F = 102,4$ ,  $gl = 3$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 1). En el ANOVA de medidas repetidas encontramos diferencias significativas para el dpi ( $F = 72,5$ ,  $gl = 2,3$ ,  $p < 0,05$ ) y para la interacción dpi x grupo de inmunización ( $F = 8$ ,  $gl = 4,6$ ,  $p < 0,05$ ). Tras la

inoculación de WNV, el nivel de anticuerpos aumentó en todos los grupos de forma significativa hasta el 10 dpi (52 días tras la primera inyección de la vacuna (dpv)), aunque a este día el nivel medio fue significativamente menor en las vacunadas con la rE (Figura 1). A 10 dpi, el 100% de las perdicés, vacunadas o no, presentaron anticuerpos (IgG) y al final del experimento todas las aves que sobrevivieron a la infección mostraron un nivel muy similar de anticuerpos en sangre periférica (Figura 1) ( $p > 0.05$ ).

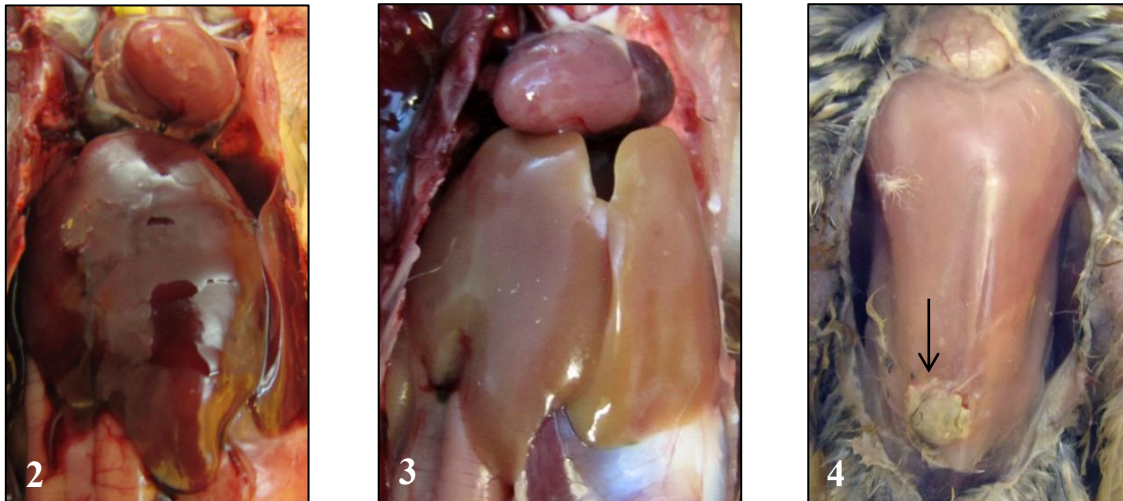


**Figura 1.** Nivel medio (por grupo) de IgG en muestras de plasma, tomadas en diferentes días experimentales, de perdicés rojas vacunadas con la proteína E recombinante (rE) de WNV (línea negra), la vacuna inactivada Duvaxyn®WNV (DV) (línea gris clara) o inyectadas con PBS (línea gris oscura) a nivel intramuscular. La línea discontinua horizontal representa el punto de corte para considerar positivo el resultado ( $P/N \geq 2$ ). Se muestran las barras de error con desviación estándar.

### 3.4. Lesiones macroscópicas

En la necropsia, las perdicés control, tanto las eutanasiadas ( $n = 6$ ) como las encontradas muertas ( $n = 3$ ), mostraron lesiones macroscópicas. Éstas estuvieron más distribuidas por los tejidos entre los días 7 y 10 pi y los órganos más afectados fueron el corazón, hígado, bazo y riñón. Fue característica la presencia de palidez del miocardio así como del parénquima hepático, esplénico y renal (3/9), esplenomegalia y hepatomegalia (2/9), y áreas multifocales amarillentas o rojizas en el hígado (2/9) (Figuras 2 y 3). Otras lesiones macroscópicas observadas fueron distensión de las asas intestinales (7/9) y distensión del buche, que en algunos casos presentó una pseudomembrana blanquecina cubriendo la mucosa (2/9). En las perdicés vacunadas con la rE que fueron sometidas a necropsia ( $n = 7$ ) se encontraron lesiones a nivel de la musculatura pectoral en la zona de inyección de la vacuna, consistentes en la presencia de nódulos o quistes de consistencia firme y de coloración blanquecina o

amarillenta (4/7) (Figura 4). Además, se observaron otras lesiones como hepatomegalia (3/7) y distensión de las asas intestinales (4/7). En las perdices vacunadas con DV a las que se les realizó necropsia (n = 5) se encontró palidez de la musculatura pectoral (1/5) y distensión de los ciegos (4/5).



**Figura 2** Imagen macroscópica del corazón e hígado de una perdiz roja no vacunada encontrada muerta a 8 dpi. Hepatomegalia y congestión hepática.

**Figura 3.** Imagen macroscópica del corazón e hígado de una perdiz roja no vacunada eutanasiada a 14 dpi. Palidez del miocardio y del parénquima hepático.

**Figura 4.** Imagen macroscópica de la musculatura pectoral de una perdiz roja vacunada con la rE y necropsiada a 7 dpi (49 días después de la primera inyección de la vacuna (dpv)). Nódulo de consistencia firme y coloración amarillenta en la parte inferior de la musculatura pectoral derecha (flecha).

### 3.5. Detección del virus en tejidos

En el grupo control sólo el corazón de la perdiz encontrada muerta a 7 dpi y el encéfalo de una eutanasiada a 10 dpi fueron positivos en la RT-PCR en tiempo real. Mientras que no se detectó genoma de WNV en ningún tejido de las perdices vacunadas con rE, el encéfalo, hígado, bazo y riñón de la perdiz vacunada con DV y eutanasiada a 3 dpi fueron positivos.

### 3.6. Lesiones microscópicas

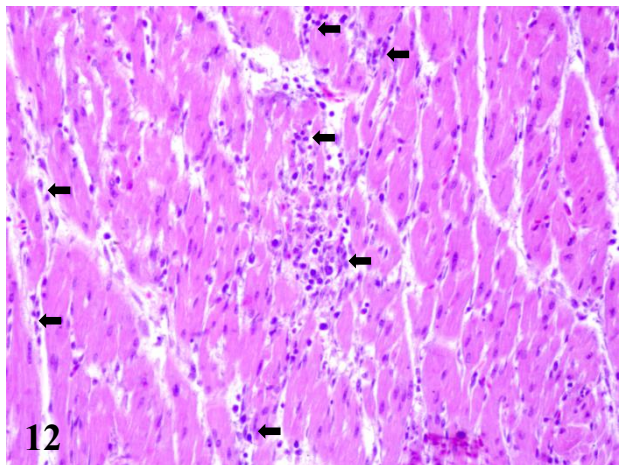
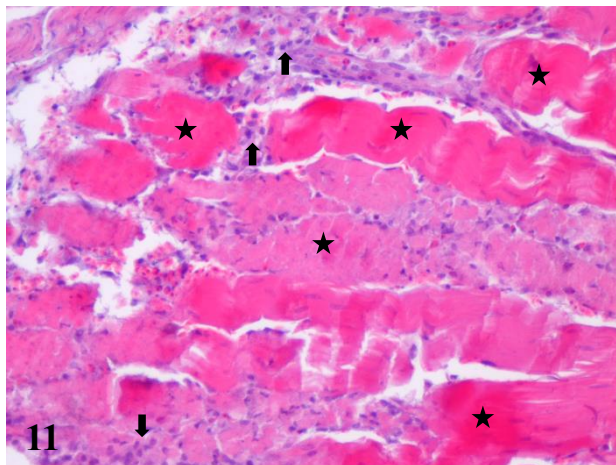
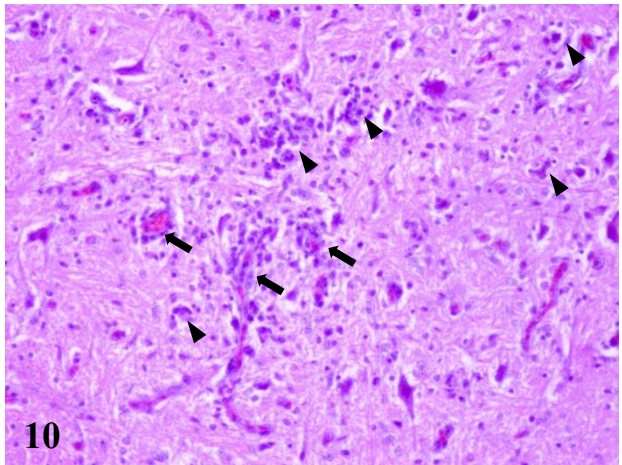
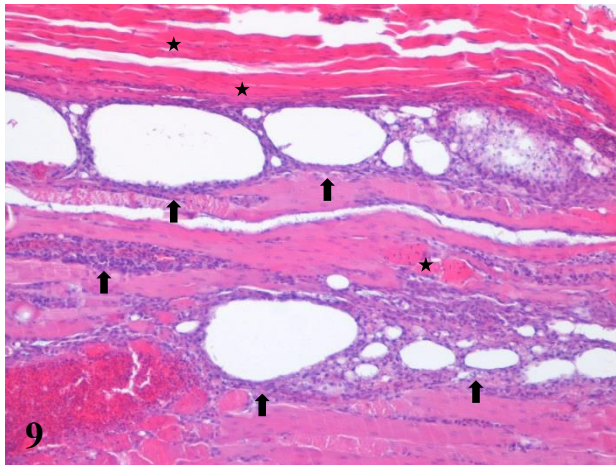
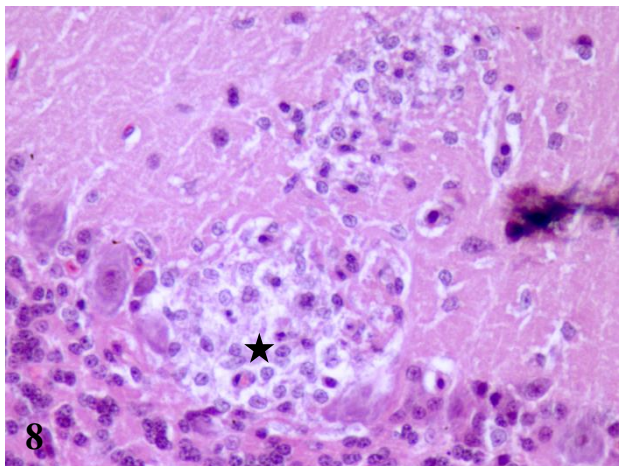
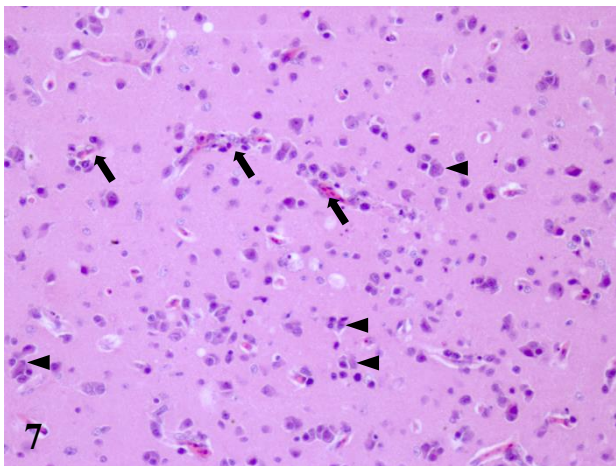
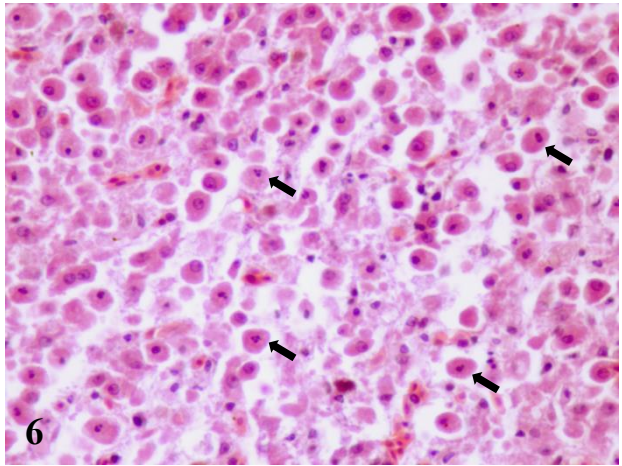
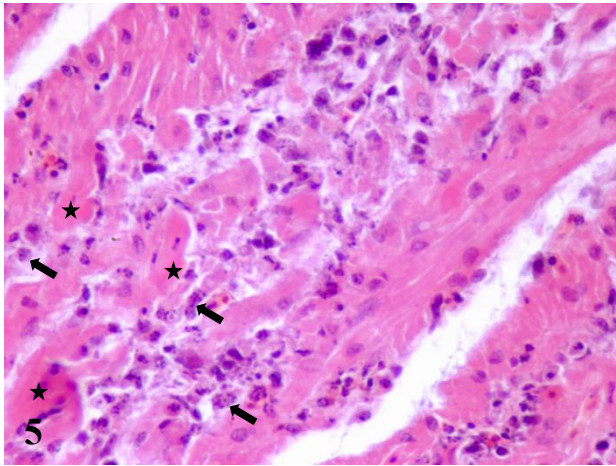
En los individuos no vacunados se encontraron lesiones microscópicas más o menos severas, fundamentalmente a partir del 7 dpi. Los tejidos más afectados fueron el encéfalo, la médula espinal y el corazón (Tabla 3). El bazo, hígado, riñón, páncreas y bolsa de Fabricio también se vieron moderadamente afectados en los individuos encontrados muertos (Tabla 3). Las lesiones más características fueron la presencia de infiltrados inflamatorios mononucleares, degeneración y necrosis celular, y hemosiderosis en el bazo y el hígado (Figuras 5 y 6). En el SNC encontramos, sobre todo, necrosis neuronal, infiltrados inflamatorios mononucleares, gliosis, satelitosis, fagocitosis neuronal y manguitos perivasculares (Figuras 7 y 8). La lesiones a este nivel fueron más severa entre los días 7 y 10 pi (Tabla 3), aunque a día 14 se



encontró una gliosis moderada a nivel del cerebro, cerebelo y la zona del puente y la médula oblongada (Tabla 3). Las perdices encontradas muertas presentaron, además, depleción linfocítica en timo, bazo y bolsa de Fabricio (Tabla 3). No se observaron lesiones en las tonsilas cecales, glándula adrenal, testículo, ovario, músculo pectoral o la piel.

El 100% de las perdices vacunadas con la rE y necropsiadas mostraron lesiones microscópicas a nivel de la musculatura pectoral, donde se observó la formación de vacuolas (espacios ocupados por aceite mineral procedente del adyuvante de la vacuna) rodeadas por una pared de tejido conjuntivo e infiltrados inflamatorios mononucleares (en algunos casos severos), así como degeneración y necrosis de miofibrillas (Figura 9). En algunos individuos (4/7) se detectaron infiltrados inflamatorios mononucleares entre el tejido conjuntivo de la dermis situada cerca de la zona de inyección de la vacuna. También fue característica la presencia en el corazón de infiltrados inflamatorios mononucleares en el miocardio y/o pericardio (5/7) y degeneración de miofibrillas de carácter leve (3/7) (Tabla 3). Dos perdices, una eutanasiada a 10 dpi y otra a 14 dpi, presentaron lesiones microscópicas a nivel del encéfalo. Estas fueron más graves en el individuo eutanasiado a 10 dpi, el cual también mostró lesiones a nivel de la médula espinal (Tabla 3, figura 10). Otros órganos que presentaron lesiones leves, fundamentalmente infiltrados inflamatorios, en un escaso número de individuos (1 o 2) fueron el pulmón, hígado, riñón y páncreas (Tabla 3). En el bazo y el timo se detectó una granulocitosis difusa marcada. No se observaron lesiones en las tonsilas cecales, bolsa de Fabricio, glándula adrenal, testículo y ovario.

El 100% los individuos vacunados con DV mostraron degeneración de las fibrillas de la musculatura pectoral caracterizada por un engrosamiento, un incremento de la eosinofilia y una pérdida de la estriación transversal (Figura 11). Sólo el individuo eutanasiado a 7 dpi mostró infiltrados inflamatorios mononucleares leves. Tres perdices presentaron infiltrados inflamatorios en la dermis. En el individuo eutanasiado a 3 dpi se observó degeneración de miofibrillas e infiltración de células inflamatorias en el corazón (Figura 12), infiltrados inflamatorios en el pulmón y riñón, necrosis de hepatocitos y depleción linfocítica en el bazo, todo ello de carácter leve (Tabla 3). Además, se detectó la presencia de infiltrados inflamatorios perivasculares leves en el cerebro y una fagocitosis neuronal leve en cerebro y médula espinal (Tabla 3). A 14 dpi una perdiz presentó miocarditis leve y dos perdices infiltrados inflamatorios en el pulmón (Tabla 3).



**Figura 5.** Imagen microscópica del miocardio de una perdiz roja no vacunada encontrada muerta a 8 dpi. Necrosis focal marcada y degeneración de miofibrillas caracterizadas por una fragmentación del núcleo (flechas) así como una fragmentación e incremento de la eosinofilia del citoplasma (estrellas). Infiltración multifocal de linfocitos, células plasmáticas e histiocitos. HE, x400.

**Figura 6.** Imagen microscópica del hígado de una perdiz roja no vacunada encontrada muerta a 7 dpi. Necrosis difusa marcada de hepatocitos caracterizada por picnosis y fragmentación del núcleo así como degeneración del citoplasma (flechas). HE, x400.

**Figura 7.** Imagen microscópica del cerebro de una perdiz roja no vacunada encontrada muerta a 8 dpi. Gliosis difusa moderada con infiltración perivascular de linfocitos e histiocitos (flechas), y degeneración y satelitosis neuronal multifocal moderada (puntas de flecha). HE, x200.

**Figura 8.** Imagen microscópica del cerebelo de una perdiz roja no vacunada eutanasiada a 10 dpi. Necrosis focal moderada de células de Purkinje (estrella), así como gliosis focal moderada y degeneración de la capa molecular. HE, x400.

**Figura 9.** Imagen microscópica de la musculatura pectoral de una perdiz roja vacunada con la rE y necropsiada a 3 dpi (45 dpv). Presencia de vacuolas intrafibrilares multifocales rodeadas por una pared de tejido conjuntivo e infiltrados de linfocitos e histiocitos (flechas). Degeneración multifocal marcada de miofibrillas caracterizada por un incremento en la eosinofilia y una pérdida de la estriación transversal (estrellas). HE, x100.

**Figura 10.** Imagen microscópica de la sustancia blanca de la médula espinal de una perdiz roja vacunada con la rE y necropsiada a 10 dpi (52 dpv). Gliosis multifocal marcada con infiltración perivascular de linfocitos, células plasmáticas e histiocitos (flechas), y necrosis y fagocitosis neuronal multifocal moderada (puntas de flecha). HE, x200.

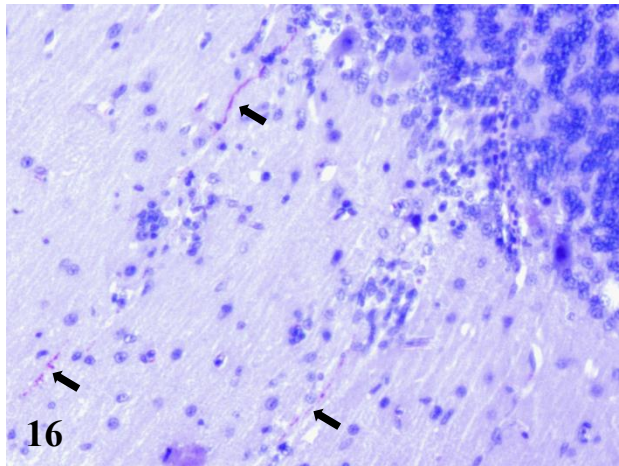
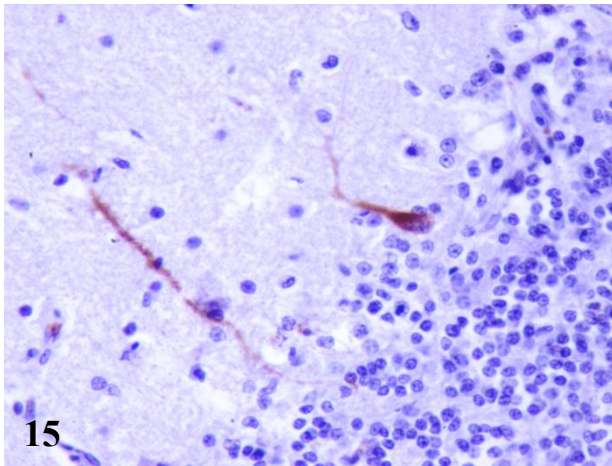
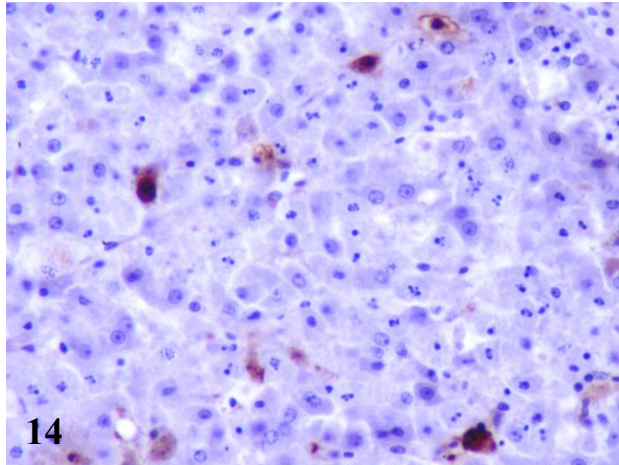
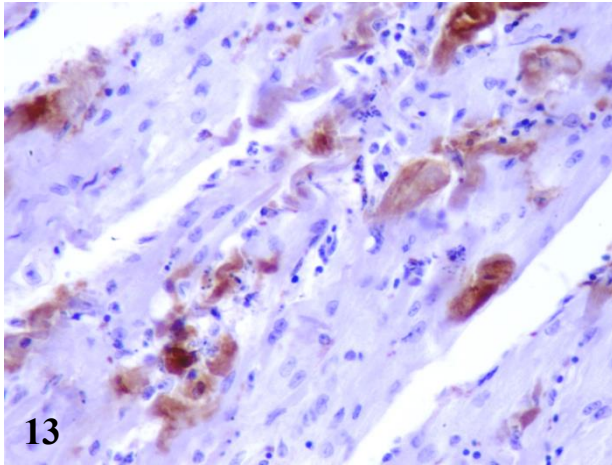
**Figura 11.** Imagen microscópica de la musculatura pectoral de una perdiz roja vacunada con DV y necropsiada a 10 dpi (52 dpv). Degeneración multifocal marcada de miofibrillas, caracterizada por un engrosamiento, incremento en la eosinofilia y una pérdida de la estriación transversal (estrellas), e infiltración multifocal leve de linfocitos (flechas). HE, x200.

**Figura 12.** Imagen microscópica del miocardio de una perdiz roja vacunada con DV y necropsiada a 3 dpi (45 dpv). Degeneración de miofibrillas multifocal leve las cuales han sido remplazadas por una infiltración multifocal moderada de linfocitos, células plasmáticas e histiocitos (flechas). HE, x200.

### 3.7. Inmunohistoquímica

En las perdices control, el antígeno detectado por IHQ fue escaso pero ampliamente distribuido por los tejidos, sobre todo a partir del 7 dpi (Tabla 3). Éste fue observado a nivel del citoplasma de miofibrillas cardiacas (Figura 13), células mesangiales y epiteliales tubulares del riñón, células acinares del páncreas, y algunas paredes vasculares en el bazo. En las perdices encontradas muertas el antígeno también fue detectado en hepatocitos y células de Kupffer del hígado (Figura 14), y en las perdices eutanasiadas en algunos macrófagos del bazo. A nivel del sistema nervioso, un individuo eutanasiado a 7 dpi mostró una célula inflamatoria intravascular positiva en el cerebro, dos perdices eutanasiadas a 10 dpi presentaron antígeno en el citoplasma y los axones de escasas células de Purkinje (Figura 15) y en alguna célula de la glía, y en una eutanasiada a 14 dpi se detectó una célula inflamatoria intravascular teñida a nivel de la médula espinal.

En el grupo vacunado con la rE sólo se detectó el antígeno de WNV en una miofibrilla del corazón y dos axones de células de Purkinje del cerebelo de la perdiz eutanasiada a 10 dpi que mostró una encefalitis severa (Tabla 3, figura 16). No se detectó antígeno en ninguno de los tejidos analizados de las perdices vacunadas con DV.



**Figura 13.** Imagen microscópica del miocardio de una perdiz roja no vacunada encontrada muerta a 8 dpi. Antígeno de WNV en el citoplasma de varias miofibrillas cardiacas. Técnica IHQ para la detección de WNV, contratinción con hematoxilina de Mayer, x400.

**Figura 14.** Imagen microscópica del hígado de una perdiz roja no vacunada encontrada muerta a 7 dpi. Antígeno de WNV en el citoplasma de hepatocitos y células de Kupffer. Técnica IHQ para la detección de WNV, contratinción con hematoxilina de Mayer, x400.

**Figura 15.** Imagen microscópica del cerebelo de una perdiz roja no vacunada eutanasiada a 10 dpi. Antígeno de WNV en el citoplasma de una célula de Purkinje y los axones de varias de ellas. Técnica IHQ para la detección de WNV, contratinción con hematoxilina de Mayer, x400.

**Figura 16.** Imagen microscópica del cerebelo de una perdiz roja vacunada con la rE y necropsiada a 10 dpi (52 dpv). Antígeno de WNV en los axones de varias células de Purkinje (flechas). Técnica IHQ para la detección de WNV, contratinción con hematoxilina de Mayer, x200.

**Tabla 3.** Valoración de la severidad de lesiones microscópicas y detección del antígeno viral a diferentes días post inoculación (dpi) en tejidos de peridices rojas infectadas de forma experimental con WNV.

Dpi	Perdiz	Severidad de lesiones <sup>a</sup>										Tinción del antígeno (IHQ) <sup>b</sup>																									
		CBR	CBL	LOP	PMO	MES	COR	PUL	HIG	BAZ	RIÑ	CBR	CBL	LOP	PMO	MES	COR	PUL	HIG	BAZ	RIÑ																
2	PBS 1*	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PBS 2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3	rE 1	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	DV 1	1	0	0	0	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	PBS 3*	3	2	0	2	0	3	0	0	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1
	PBS 4	1	0	0	0	1	2	2	1	2	1	1	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5
8	rE 2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	rE 3	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	DV 2	0	0	0	0	0	NA	NA	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PBS 5*	2	1	2	1	1	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5	1
14	PBS 6	2	1	1	1	1	2	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0,5	1	
	PBS 7	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	rE 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	rE 5	3	2	2	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	DV 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PBS 8	2	2	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	PBS 9	2	0	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	rE 6	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	rE 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	DV 4	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	DV 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Gradación de lesiones en tejidos (infiltración inflamatoria y/o necrosis celular; depleción linfóide en el caso del bazo): CBR, cerebro; CBL, cerebelo; LOP, lóbulo óptico; PMO, puente y médula oblongada; MES, médula espinal; COR, corazón; PUL, pulmón; HIG, hígado; BAZ, bazo; RIÑ, riñón. 0 = ausencia de lesiones; 1 = lesiones leves; 2 = lesiones moderadas; 3 = lesiones marcadas.  
<sup>b</sup> Gradación de la detección de antígeno por IHQ en los diferentes tejidos. 0 = ausencia de antígeno; 0,5 = una o dos células aisladas; 1 = <20% células, focales o multifocales; 2 = 20-70% células, multifocales o difusas; 3 = >70% células, multifocales o difusas.  
 \* Individuos encontrados muertos.  
 NA: tejidos no analizados.

## 4. Discusión

En este trabajo hemos demostrado, por una parte, que la perdiz roja, una especie euromediterránea endémica, es susceptible a la infección experimental con una cepa norteamericana de WNV, desarrollando viremia, lesiones, signos clínicos y mortalidad. Por otro lado, que dos vacunas distintas, una elaborada a partir de la proteína de la envoltura de WNV recombinante y otra a partir de virus completo inactivado, tienen una eficacia protectora diferente frente a la infección experimental de esta especie con este flavivirus.

La perdiz roja pertenece a la familia *Phasianidae* del orden Galliformes. Generalmente, las aves de este orden son consideradas poco susceptibles a la infección por WNV (Komar et al., 2003; Guy y Malkinson, 2008), ya que la mayoría no muestra signos clínicos ni mortalidad, si bien desarrollan viremia y producen anticuerpos frente al virus (Senne et al., 2000; Swayne et al., 2000; Langevin et al., 2001). Sin embargo, la infección por WNV ha dado lugar a casos de mortalidad esporádica en algunas especies de este orden (Steele et al., 2000; Naugle et al., 2004; Zhang et al., 2006) y en Norteamérica provocó un brote de elevada mortalidad que afectó a granjas de perdiz chukar (*Alectoris chukar*) y faisanes reales (*Lophophorus impeyanus*) (Wünschmann y Ziegler, 2006). La perdiz roja además ha demostrado ser susceptible a la infección experimental con otras cepas de WNV, sufriendo una mortalidad de entre el 30% y el 70% (Sotelo et al., 2011).

En el presente trabajo, casi todas las perdices control desarrollaron viremia, cuya concentración media a 3 dpi, como era de esperar, fue significativamente mayor en las perdices que sucumbieron a la infección que en las que fueron eutanasiadas. En una de las perdices la concentración de virus en sangre alcanzó  $9,6 \times 10^4$  UFP/ml, lo que está muy cercano al nivel necesario para infectar a un mosquito y tener, por tanto, capacidad para mantener el ciclo de transmisión (Turell et al., 2001). No obstante, este nivel queda muy por debajo del obtenido en un trabajo experimental previo en el que la viremia media desarrollada por las perdices fue de hasta  $10^{7.2}$  UFP/ml (Sotelo et al., 2011).

La mayoría de las perdices control desarrollaron lesiones macroscópicas y microscópicas muy similares a las que se observan en otras aves infectadas con el mismo flavivirus (Steele et al., 2000). El SNC y el corazón se vieron especialmente afectados, fundamentalmente a partir del 7 dpi. Un resultado similar se obtuvo al infectar halcones híbridos con la misma cepa (Busquets et al., 2012). Sin embargo, sólo se detectó material genético del virus por RT-PCR en dos individuos, precisamente en estos tejidos, y la cantidad de antígeno detectado por IHQ fue escaso. Todos estos hallazgos parecen indicar que se

produjo una escasa replicación del virus en los tejidos y una rápida eliminación del mismo por parte de la respuesta inmune del hospedador. Esta respuesta a su vez contribuyó, al menos en parte, al desarrollo de las lesiones microscópicas encontradas en los distintos órganos.

Hasta la fecha no existe ninguna vacuna con licencia para proteger frente a la infección por WNV a las aves, a pesar de los numerosos estudios que se han realizado. El uso de la proteína E recombinante ha demostrado ser eficaz en algunas especies de aves (Jarvi et al., 2008; Fassbinder-Orth et al., 2009); sin embargo, las diferencias en el sistema de producción de la vacuna o el adyuvante utilizado, en el esquema de administración de la misma, así como en la especie inmunizada o la cepa de WNV utilizada para infectar, hacen difícil la comparación entre estudios. La vacuna utilizada en nuestro trabajo fue previamente testada en ratones (Alonso-Padilla et al., 2011) y, al igual que en el presente estudio, ninguno de los ratones vacunados mostró signos clínicos o murió tras la inoculación de WNV. Sin embargo, mientras que en los ratones se consideró que la inmunidad conferida fue esterilizante, en nuestro trabajo un 20% de las perdices vacunadas mostraron viremia a 3 dpi y un incremento en el título de anticuerpos hasta alcanzar, al final del experimento, un nivel medio muy similar al de los individuos no vacunados, lo que indica que el virus consiguió replicarse. No obstante, el título medio de la viremia de las perdices vacunadas con la rE fue significativamente menor al de las perdices no vacunadas y quedó por debajo de lo que sería necesario para infectar a mosquitos (Turell et al., 2001). Unos resultados similares a estos han sido obtenidos en gansos domésticos (*Anser anser*) y pollos de gallina doméstica (*Gallus gallus*) inmunizados con vacunas similares (Jarvi et al., 2008; Fassbinder-Orth et al., 2009).

Tal y como se ha encontrado en otros trabajos realizados en aves y primates (Jarvi et al., 2008; Fassbinder-Orth et al., 2009; Lieberman et al., 2009; Sá E. Silva et al., 2013), una sola inmunización con la rE no fue suficiente para inducir la producción de anticuerpos IgG. Sin embargo, el 70% de las perdices fue ELISA positivo tras la segunda inyección de la vacuna y el nivel de IgG aumentó de forma significativa hasta después de la tercera dosis vacunal. Tras la inoculación de WNV, el nivel medio de anticuerpos incrementó de forma menos acusada que en los otros dos grupos, pero al final del experimento (14 dpi), este nivel fue muy similar entre los tres grupos de inmunización. Este hallazgo es muy similar al encontrado en otros trabajos, aunque no con el mismo candidato vacunal (Redig et al., 2011; Wheeler et al., 2011).

A pesar de que la supervivencia de las perdices vacunadas con la rE fue del 100%, encontramos lesiones macroscópicas y microscópicas en los órganos de muchas de las aves a

las que se les realizó la necropsia, que afectaron sobre todo al músculo pectoral y al corazón y, en menor número de individuos, al SNC, pulmón, hígado y riñón. Es muy probable que las lesiones encontradas a nivel del SNC de la perdiz eutanasiada a 10 dpi, en la que además se detectó antígeno de WNV por IHQ en los axones de varias células de Purkinje, hubiesen comprometido la supervivencia de la misma en caso de que no hubiese sido eutanasiada o el experimento hubiese progresado. Por otro lado, no sabemos cómo habrían evolucionado las lesiones encontradas en el corazón de cinco de los individuos eutanasiados a diferentes dpi. No obstante, en términos generales, la rE redujo la severidad de las lesiones y el número de individuos con lesiones o con antígeno en tejidos; sin embargo, y dado el bajo número de perdices necropsiadas a cada dpi, es difícil llegar a una conclusión clara sobre la eficacia de esta vacuna para contribuir a reducir estos aspectos. Las lesiones encontradas a nivel de la musculatura pectoral muy probablemente estuvieron relacionadas con el adyuvante de la vacuna. La mayoría de vacunas inactivadas suelen formularse con adyuvantes con la finalidad de potenciar la respuesta inmune del hospedador (Cox y Coulter, 1997). De acuerdo al fabricante, el adyuvante Stimune potencia la respuesta de los linfocitos B y tan sólo da lugar a una ligera degeneración muscular en la zona de inyección. En nuestro trabajo, las lesiones que presentaron las perdices fueron bastante severas, no obstante, hemos comprobado que disminuyendo el volumen administrado por punto e incrementando el número de puntos de inyección se reduce la severidad de las mismas (Gamino et al., 2012b). Desconocemos las consecuencias de estas lesiones para la supervivencia de las perdices, aunque no encontramos signos clínicos asociados a la vacunación. Sin embargo, y en caso de que esta vacuna se utilizase para inmunizar individuos destinados al consumo humano, habría que realizar estudios para determinar si es posible la reversión de estas lesiones y el tiempo que esto supondría, así como una posible reformulación de la vacuna. Aunque los depósitos de aceite mineral se destruyen durante el cocinado de la carne, las lesiones podrían producir rechazo en el consumidor, siendo necesaria la eliminación de las zonas afectadas con las consecuentes pérdidas económicas para el productor (Droual et al., 1990).

La vacuna Duvaxyn<sup>®</sup>WNV por su parte ha sido utilizada en numerosos estudios experimentales (bajo el nombre de West Nile Innovator<sup>™</sup> (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge (IA), EEUU)), ya que es la primera que se comercializó para su uso en caballos (USDA-APHIS). El fabricante recomienda inyectar a caballos 1 ml de la vacuna vía intramuscular en dos dosis separadas 3-5 semanas, revacunado con una dosis anual. En nuestro trabajo redujimos la dosis a 0,2 ml y realizamos la inmunización tres veces a



intervalos de dos semanas, sin conseguir que ninguna de las perdices desarrollara anticuerpos detectables por el ELISA antes de la inoculación de WNV. Aunque el nivel medio de anticuerpos en estas aves incrementó en respuesta a la infección, el perfil fue muy similar al de las perdices no vacunadas, alcanzando a 14 dpi unos niveles similares al de los otros dos grupos. Esto indica, por un lado, que la producción de IgG por las perdices vacunadas con DV en respuesta a la infección con WNV fue muy similar a la de las no vacunadas y, por otro lado, que dicha inmunidad no fue esterilizante. Lamentablemente no pudimos determinar el nivel de viremia alcanzado en estas aves.

A 2 dpi uno de los individuos vacunados con DV fue encontrado con signos compatibles con la infección por WNV y tuvo que ser eutanasiado a 3 dpi, por lo que consideramos que esta vacuna no fue capaz de reducir la morbilidad ni la mortalidad de manera significativa. Sin embargo, el número de individuos en estudio fue relativamente bajo, por lo que es difícil llegar a conclusiones claras. En la perdiz anteriormente citada además se detectó material genético del virus por RT-PCR en el encéfalo, bazo, hígado y riñón, y se observaron lesiones microscópicas. No obstante, en términos generales, la vacuna DV, al igual que la rE, redujo la severidad de las lesiones así como el número de individuos con lesiones y antígeno en tejidos pero, de nuevo, debido al bajo número de individuos analizados a cada dpi, es difícil determinar la eficacia real de esta vacuna para reducir estos aspectos. En este caso, y a diferencia de lo que ocurrió en las perdices vacunadas con la rE, las lesiones macroscópicas en el músculo pectoral no fueron tan llamativas, siendo más leves también a nivel microscópico.

## **5. Conclusión**

En conclusión, en este estudio hemos confirmado por primera vez la susceptibilidad de la perdiz roja a la infección con una cepa de WNV aislada en Norteamérica y, por tanto, su potencial uso como modelo experimental de bajo coste y fácil manejo para estudiar la enfermedad asociada a la infección por este flavivirus. No obstante, y dado los resultados obtenidos, hemos visto que la cepa infectante (a pesar del elevado título utilizado para infectar,  $10^7$  UFP/ml) tiene una virulencia moderada para esta especie. Por otro lado, hemos demostrado que ninguna de las vacunas estudiadas tiene una eficacia del 100% para proteger a las perdices frente a la infección por WNV. No obstante, la rE es capaz de inducir la producción de anticuerpos que permiten una reducción en la morbilidad, la mortalidad, el nivel de viremia y el número de individuos con virus en sangre de manera significativa. La

reducción en el nivel de viremia es importante para la interrupción del ciclo de transmisión; sin embargo, si el objetivo es usar esta vacuna para la protección de especies amenazadas o de alto valor económico, se debería optimizar al máximo su capacidad de reducir el número de individuos con lesiones o la severidad de las mismas. La vacuna DV por su parte, a pesar de que tiene la capacidad de inducir una respuesta inmune tanto humoral como celular (Davis et al., 2008), no es lo suficientemente efectiva para proteger a la perdiz roja frente a la infección por WNV, al no inducir el desarrollo de anticuerpos IgG y no reducir de manera significativa ni la morbilidad ni la mortalidad.

Por todo esto, consideramos que es necesario realizar futuros estudios con un mayor número de individuos con la finalidad de optimizar el proceso de vacunación (formulación con el adyuvante, dosis o protocolo de inmunizaciones), determinar la capacidad de reducción de la severidad o el número de individuos con lesiones así como virus en tejidos, y determinar la duración máxima de la protección. Todo esto nos ayudará a demostrar si alguna de estas vacunas es un candidato comercial para proteger a las aves frente a la infección por WNV.

## 6. Bibliografía

- Aebischer NJ, Potts GR: **Red-legged Partridge (*Alectoris rufa*)**. En: *Birds in Europe, their conservation status*. Editado por Tucker GM, Heath FM. Cambridge: BirdLife International; 1994: 214-215.
- Alonso-Padilla J, Jiménez de Oya N, Blázquez AB, Loza-Rubio E, Escribano JM, Saiz JC, Escribano-Romero E: **Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of West Nile virus infection based on a recombinant envelope protein produced in *Trichoplusia ni* larvae**. *J Virol Methods* 2010, **166**(1-2):37-41.
- Alonso-Padilla J, de Oya NJ, Blázquez AB, Escribano-Romero E, Escribano JM, Saiz JC: **Recombinant West Nile virus envelope protein E and domain III expressed in insect larvae protects mice against West Nile disease**. *Vaccine* 2011, **29**(9):1830-1835.
- Bagnarelli P, Marinelli K, Trotta D, Monachetti A, Tavio M, Del Gobbo R, Capobianchi M, Menzo S, Nicoletti L, Magurano F, Varaldo P: **Human case of autochthonous West Nile virus lineage 2 infection in Italy, September 2011**. *Euro Surveill* 2011, **16**(43).
- Bakonyi T, Ivanics T, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, Nowotny N: **Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe**. *Emerg Infect Dis* 2006, **12**(4):618-623.
- Banet-Noach C, Simanov L, Malkinson M: **Direct (non-vector) transmission of West Nile virus in geese**. *Avian Pathol* 2003, **32**(5):489-494.
- Bertelsen MF, Olberg RA, Crawshaw GJ, Dibbernardo A, Lindsay LR, Drebot M, Barker IK: **West Nile virus infection in the eastern loggerhead shrike (*Lanius ludovicianus*)**

- migrans): Pathology, epidemiology, and immunization.** *J Wildl Dis* 2004, **40**(3):538-542.
- Blanco-Aguilar JA, Virgós E, Villafuerte R: **Perdiz roja (*Alectoris rufa*).** En: *Atlas de las aves reproductoras de España*. Editado por Martí R, del Moral JC. Madrid: DGCoNa-SEO; 2003: 212-213.
- Blanco-Aguilar JA: **Variación espacial en la biología de la perdiz roja (*Alectoris rufa*); una aproximación multidisciplinar.** Tesis Doctoral, Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2007.
- Blitvich BJ, Marlenee NL, Hall RA, Calisher CH, Bowen RA, Roehrig JT, Komar N, Langevin SA, Beaty BJ: **Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies to west nile virus in multiple avian species.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**(3):1041-1047.
- Boyce WM, Vickers W, Morrison SA, Sillett TS, Caldwell L, Wheeler SS, Barker CM, Cummings R, Reisen WK: **Surveillance for West Nile virus and vaccination of free-ranging island scrub-jays (*Aphelocoma insularis*) on Santa Cruz Island, California.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011, **11**(8):1063-1068.
- Brandler S, Tangy F: **Vaccines in development against West Nile virus.** *Viruses* 2013, **5**(10):2384-2409.
- Brinton MA: **The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere.** *Annu Rev Microbiol* 2002, **56**:371-402.
- Busquets N, Bertrán K, Costa TP, Rivas R, de la Fuente JG, Villalba R, Solanes D, Bensaid A, Majó N, Pages N: **Experimental West Nile virus infection in Gyr-Saker hybrid falcons.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012, **12**(6):482-489.
- Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE: **Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera.** *J Gen Virol* 1989, **70** ( Pt 1):37-43.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDCa)  
[<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/index.htm>]
- Centers for Disease Control and Prevention (CDCb)  
[<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/birdspecies.htm>]
- Córdoba L, Escribano-Romero E, Garmendia A, Saiz JC: **Pregnancy increases the risk of mortality in West Nile virus-infected mice.** *J Gen Virol* 2007, **88**:476-480.
- Cox JC, Coulter AR: **Adjuvants--a classification and review of their modes of action.** *Vaccine* 1997, **15**(3):248-256.
- Chambers TJ, Diamond MS: **Pathogenesis of flavivirus encephalitis.** *Adv Virus Res* 2003, **60**:273-342.

- Chang GJ, Davis BS, Stringfield C, Lutz C: **Prospective immunization of the endangered California condors (*Gymnogyps californianus*) protects this species from lethal West Nile virus infection.** *Vaccine* 2007, **25**(12):2325-2330.
- Davis EG, Zhang Y, Tuttle J, Hankins K, Wilkerson M: **Investigation of antigen specific lymphocyte responses in healthy horses vaccinated with an inactivated West Nile virus vaccine.** *Vet Immunol Immunopathol* 2008, **126**(3-4):293-301.
- De Filette M, Ulbert S, Diamond M, Sanders NN: **Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination.** *Vet Res* 2012, **43**.
- Droual R, Bickford AA, Charlton BR, Kuney DR: **Investigation of problems associated with intramuscular breast injection of oil-adjuvanted killed vaccines in chickens.** *Avian Dis* 1990, **34**(2):473-478.
- Ebel GD, Dupuis AP, 2nd, Nicholas D, Young D, Maffei J, Kramer LD: **Detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to West Nile virus in birds.** *Emerg Infect Dis* 2002, **8**(9):979-982.
- Fassbinder-Orth CA, Hofmeister EK, Weeks-Levy C, Karasov WH: **Oral and parenteral immunization of chickens (*Gallus gallus*) against West Nile virus with recombinant envelope protein.** *Avian Dis* 2009, **53**(4):502-509.
- Figuerola J, Jiménez-Clavero MA, Rojo G, Gómez-Tejedor C, Soriguer R: **Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in colonial aquatic birds in southern Spain.** *Avian Pathol* 2007, **36**(3):209-212.
- Figuerola J, Jiménez-Clavero MA, López G, Rubio C, Soriguer R, Gómez-Tejedor C, Tenorio A: **Size matters: West Nile Virus neutralizing antibodies in resident and migratory birds in Spain.** *Vet Microbiol* 2008, **132**(1-2):39-46.
- Fitzgerald SD, Patterson JS, Kiupel M, Simmons HA, Grimes SD, Sarver CE, Fulton RM, Steficek BA, Cooley TM, Massey JP, Sikarskie JG: **Clinical and pathologic features of West Nile virus infection in native North American owls (Family *Strigidae*).** *Avian Dis* 2003, **47**(3):602-610.
- Foppa IM, Beard RH, Mendenhall IH: **The impact of West Nile virus on the abundance of selected North American birds.** *Vet Res* 2011, **7**:43.
- Gamino V, Gutiérrez-Guzmán AV, Fernández-de-Mera IG, Ortíz JA, Durán-Martín M, de la Fuente J, Gortázar C, Höfle U: **Natural Bagaza virus infection in game birds in southern Spain.** *Vet Res* 2012a, **43**(1):65.
- Gamino V, Gutiérrez-Guzmán AV, Escribano-Romero E, Blázquez A-B, Saiz J-C, Höfle U: **Lesions associated with intramuscular vaccination against West Nile virus in red-legged partridges (*Alectoris rufa*).** En: *30th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, Annual Meeting of the European College of Veterinary Pathologists and the 24th Annual Meeting of the Spanish Society of Veterinary Pathology*. León, 2012b: 215.

- Gamino V, Höfle U: **Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review.** *Vet Res* 2013, **44**(1).
- García-Bocanegra I, Jaén-Tellez JA, Napp S, Arenas-Montes A, Fernández-Morente M, Fernández-Molera V, Arenas A: **West Nile fever outbreak in horses and humans, Spain, 2010.** *Emerg Infect Dis* 2011, **17**(12):2397-2399.
- García-Bocanegra I, Jaén-Tellez JA, Napp S, Arenas-Montes A, Fernández-Morente M, Fernández-Molera V, Arenas A: **Monitoring of the West Nile Virus epidemic in Spain between 2010 and 2011.** *Transb Emerg Dis* 2012, **59**(5):448-455.
- Gaunt MW, Sall AA, de Lamballerie X, Falconar AK, Dzhivianian TI, Gould EA: **Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography.** *J Gen Virol* 2001, **82**(Pt 8):1867-1876.
- Gibbs SEJ, Hoffman DM, Stark LM, Marlenee NL, Blitvich BJ, Beaty BJ, Stallknecht DE: **Persistence of antibodies to West Nile virus in naturally infected rock pigeons (*Columba livia*).** *Clin Diagn Lab Immunol* 2005, **12**(5):665-667.
- Guy JS, Malkinson M: **Arbovirus infections.** En: *Diseases of Poultry*. Editado por Saif YM. Ames: Blackwell Publishing; 2008: 414-425.
- Hahn DC, Nemeth NM, Edwards E, Bright PR, Komar N: **Passive West Nile virus antibody transfer from maternal Eastern Screech-Owls (*Megascops asio*) to progeny.** *Avian Dis* 2006, **50**(3).
- Höfle U, Blanco JM, Crespo E, Naranjo V, Jiménez-Clavero MA, Sánchez A, de la Fuente J, Gortázar C: **West Nile virus in the endangered Spanish imperial eagle.** *Vet Microbiol* 2008, **129**(1-2):171-178.
- Hubálek Z, Halouzka J: **West Nile fever - a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe.** *Emerg Infect Dis* 1999, **5**(5):643-650.
- Iyer AV, Kousoulas KG: **A review of vaccine approaches for West Nile virus.** *Int J Environ Res Public Health* 2013, **10**(9):4200-4223.
- Jarvi SI, Lieberman MM, Hofmeister E, Nerurkar VR, Wong T, Weeks-Levy C: **Protective efficacy of a recombinant subunit West Nile virus vaccine in domestic geese (*Anser anser*).** *Vaccine* 2008, **26**(42):5338-5344.
- Jiménez-Clavero MA, Sotelo E, Fernández-Pinero J, Llorente F, Manuel Blanco J, Rodríguez-Ramos J, Pérez-Ramírez E, Höfle U: **West Nile virus in golden eagles, Spain, 2007.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**(9):1489-1491.
- Jiménez-Clavero MA: **Animal viral diseases and global change: bluetongue and West Nile fever as paradigms.** *Front Genet* 2012, **3**.
- Kilpatrick AM, Daszak P, Jones MJ, Marra PP, Kramer LD: **Host heterogeneity dominates West Nile virus transmission.** *Proc R Soc B-Biol Sci* 2006, **273**(1599):2327-2333.

- Kilpatrick AM, Dupuis AP, Chang GJ, Kramer LD: **DNA vaccination of American robins (*Turdus migratorius*) against West Nile virus.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010, **10**(4):377-380.
- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M: **Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus.** *Emerg Infect Dis* 2003, **9**(3):311-322.
- Kramer LD, Styer LM, Ebel GD: **A global perspective on the epidemiology of West Nile virus.** *Annu Rev Entomol* 2008, **53**:61-81.
- Kutasi O, Bakonyi T, Lecollinet S, Biksi I, Ferenczi E, Bahuon C, Sardi S, Zientara S, Szenci O: **Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile virus in Hungary.** *J Vet Intern Med* 2011, **25**(3):586-591.
- LaDeau SL, Kilpatrick AM, Marra PP: **West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations.** *Nature* 2007, **447**(7145):710-713.
- Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, Godsey MS, Mitchell CJ, Savage HM, Komar N, Panella NA, Allen BC, Volpe KE, Davis BS, Roehrig JT: **Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**(11):4066-4071.
- Lanciotti RS, Ebel GD, Deubel V, Kerst AJ, Murri S, Meyer R, Bowen M, McKinney N, Morrill WE, Crabtree MB, Kramer LD, Roehrig JT: **Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East.** *Virology* 2002, **298**(1):96-105.
- Langevin SA, Bunning M, Davis B, Komar N: **Experimental infection of chickens as candidate sentinels for West Nile virus.** *Emerg Infect Dis* 2001, **7**(4):726-729.
- Langevin SA, Brault AC, Panella NA, Bowen RA, Komar N: **Variation in virulence of West Nile virus strains for house sparrows (*Passer domesticus*).** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72**(1):99-102.
- Lieberman MM, Nerurkar VR, Luo H, Cropp B, Carrion R, Jr., de la Garza M, Collier BA, Clements D, Ogata S, Wong T, Martyak T, Weeks-Levy C: **Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant subunit West Nile virus vaccine in rhesus monkeys.** *Clin Vaccine Immunol* 2009, **16**(9):1332-1337.
- Lim PY, Behr MJ, Chadwick CM, Shi PY, Bernard KA: **Keratinocytes are cell targets of West Nile virus in vivo.** *J Virol* 2011, **85**(10):5197-5201.
- Lindenbach BD, Rice CM: **Molecular biology of flaviviruses.** *Adv Virus Res* 2003, **59**:23-61.
- López G, Jiménez-Clavero MA, Tejedor CG, Soriguer R, Figuerola J: **Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in Spain is related to the behavior of migratory birds.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008, **8**(5):615-621.
- Ludwig GV, Calle PP, Mangiafico JA, Raphael BL, Danner DK, Hile JA, Clippinger TL, Smith JF, Cook RA, McNamara T: **An outbreak of West Nile virus in a New York City captive wildlife population.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **67**(1):67-75.

- Mackenzie JS, Williams DT: **The zoonotic flaviviruses of southern, south-eastern and eastern Asia, and Australasia: the potential for emergent viruses.** *Zoonoses Public Health* 2009, **56**(6-7):338-356.
- Malkinson M, Banet C, Khinich Y, Samina I, Pokamunski S, Weisman Y: **Use of live and inactivated vaccines in the control of West Nile fever in domestic geese.** *Ann N Y Acad Sci* 2001, **951**:255-261.
- Malkinson M, Banet C: **The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa.** *Curr Top Microbiol Immuno* 2002, **267**:309-322.
- Martín-Acebes MA, Blázquez AB, Jiménez de Oya N, Escribano-Romero E, Saiz JC: **West Nile virus replication requires fatty acid synthesis but is independent on phosphatidylinositol-4-phosphate lipids.** *PLoS One* 2011, **6**(9):e24970.
- Martín-Acebes MA, Saiz JC: **West Nile virus: a re-emerging pathogen revisited.** *World J Virol* 2012, **1**(2):51-70.
- McLean R, Ubico S: **Arboviruses in Birds.** En: *Infectious Diseases of Wild Birds*. Editado por Thomas N, Hunter D, Atkinson C. Iowa: Blacwell Publishing; 2007: 17-62.
- Minke JM, Siger L, Karaca K, Austgen L, Gordy P, Bowen R, Renshaw RW, Loosmore S, Audonnet JC, Nordgren B: **Recombinant canarypoxvirus vaccine carrying the prM/E genes of West Nile virus protects horses against a West Nile virus-mosquito challenge.** *Arch Virol Suppl* 2004(18):221-230.
- Monath TP: **Prospects for development of a vaccine against the West Nile virus.** *Ann N Y Acad Sci* 2001, **951**:1-12.
- Murgue B, Zeller H, Deubel V: **The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe and Asia.** *Curr Top Microbiol Immuno* 2002, **267**:195-221.
- Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'Leary D, Murray K, Huang A, Rosenberg A, Greenberg A, Sherman M, Wong S, Layton M: **The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999.** *N Engl J Med* 2001, **344**(24):1807-1814.
- Naugle D, Aldrige C, Walker B, Cornish T, Moynahan B, Holloran M, Brown K, Johnson G, Shmidtman E, Mayer R, Kato C, Matchett M, Christainsen T, Cook W, Creekmore T, Falise R, Rines E, Boyce M: **West Nile virus: pending crisis for greater sage-grouse.** *Ecology Letters* 2004(7):704-713.
- Nemeth NM, Gould D, Bowen R, Komar N: **Natural and experimental West Nile virus infection in five raptor species.** *J Wildl Dis* 2006, **42**(1):1-13.
- Nemeth NM, Kratz GE, Bates R, Scherpelz JA, Bowen RA, Komar N: **Naturally induced humoral immunity to West Nile virus infection in raptors.** *Ecohealth* 2008, **5**(3):298-304.
- Nemeth NM, Oesterle PT, Bowen RA: **Humoral Immunity to West Nile virus Is long lasting and protective in the house sparrow (*Passer domesticus*).** *Am J Trop Med Hyg* 2009, **80**(5):864-869.

- Nemeth NM, Thomsen BV, Spraker TR, Benson JM, Bosco-Lauth AM, Oesterle PT, Bright JM, Muth JP, Campbell TW, Gidlewski TL, Bowen RA: **Clinical and pathologic responses of American crows (*Corvus brachyrhynchos*) and fish crows (*C. ossifragus*) to experimental west nile virus Infection.** *Vet Pathol* 2011, **48**(6):1061-1074.
- Ng T, Hathaway D, Jennings N, Champ D, Chiang YW, HJ C: **Equine vaccine for West Nile virus.** *Dev Biol (Basel)* 2003, **114**:221-227.
- Okeson DM, Llizo SY, Miller CL, Glaser AL: **Antibody response of five bird species after vaccination with a killed West Nile virus vaccine.** *J Zoo Wildl Med* 2007, **38**(2):240-244.
- Peterson AT, Vieglais DA, Andreasen JK: **Migratory birds modeled as critical transport agents for West Nile Virus in North America.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2003, **3**(1):27-37.
- Phalen DN, Dahlhausen B: **West Nile virus.** *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 2004, **13**(2).
- Red de Alerta Sanitaria Veterinaria (RASVE)  
[[http://rasve.magrama.es/RASVE\\_2008/Publica/Focos/Consulta.aspx](http://rasve.magrama.es/RASVE_2008/Publica/Focos/Consulta.aspx)]
- Redig PT, Tully TN, Ritchie BW, Roy AF, Baudena MA, Chang GJ: **Effect of West Nile virus DNA-plasmid vaccination on response to live virus challenge in red-tailed hawks (*Buteo jamaicensis*).** *Am J Vet Res* 2011, **72**(8):1065-1070.
- Sá E. Silva M, Ellis A, Karaca K, Minke J, Nordgren R, Wu S, Swayne DE: **Domestic goose as a model for West Nile virus vaccine efficacy.** *Vaccine* 2013, **31**(7):1045-1050.
- Samuel MA, Diamond MS: **Pathogenesis of West Nile virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion.** *J Virol* 2006, **80**(19):9349-9360.
- Senne DA, Pedersen JC, Hutto DL, Taylor WD, Schmitt BJ, Panigrahy B: **Pathogenicity of West Nile virus in chickens.** *Avian Dis* 2000, **44**(3):642-649.
- Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH: **A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda.** *Am J Trop Med Hyg* 1940, **s1-20**(4):471-492.
- Sotelo E, Gutiérrez-Guzmán AV, del Amo J, Llorente F, El-Harrak M, Pérez-Ramírez E, Manuel Blanco J, Höfle U, Jiménez-Clavero MA: **Pathogenicity of two recent Western Mediterranean West Nile virus isolates in a wild bird species indigenous to Southern Europe: the red-legged partridge.** *Vet Res* 2011, **42**.
- Steele KE, Linn MJ, Schoepp RJ, Komar N, Geisbert TW, Manduca RM, Calle PP, Raphael BL, Clippinger TL, Larsen T, Smith J, Lanciotti RS, Panella NA, McNamara TS: **Pathology of fatal West Nile virus infections in native and exotic birds during the 1999 outbreak in New York City, New York.** *Vet Pathol* 2000, **37**(3):208-224.
- Suthar MS, Diamond MS, Gale M, Jr.: **West Nile virus infection and immunity.** *Nat Rev Microbiol* 2013, **11**(2):115-128.



- Swayne DE, Beck JR, Zaki S: **Pathogenicity of West Nile virus for turkeys.** *Avian Dis* 2000, **44**(4):932-937.
- Turell MJ, O'Guinn ML, Dohm DJ, Jones JW: **Vector competence of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus.** *J Med Entomol* 2001, **38**(2):130-134.
- Turell MJ, Bunning M, Ludwig GV, Ortman B, Chang J, Speaker T, Spielman A, McLean R, Komar N, Gates R, McNamara T, Creekmore T, Farley L, Mitchell CJ: **DNA vaccine for West Nile virus infection in fish crows (*Corvus ossifragus*).** *Emerg Infect Dis* 2003, **9**(9):1077-1081.
- United States Department of Agriculture – Animal and Plant Health Inspection Service (USDA-APHIS) [[http://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/nahms/equine/downloads/wnv\\_US\\_2003.pdf](http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/equine/downloads/wnv_US_2003.pdf)]
- van der Meulen KM, Pensaert MB, Nauwynck HJ: **West Nile virus in the vertebrate world.** *Arch Virol* 2005, **150**(4):637-657.
- Weingartl HM, Neufeld JL, Copps J, Marszal P: **Experimental west nile virus infection in blue jays (*Cyanocitta cristata*) and crows (*Corvus brachyrhynchos*).** *Vet Pathol* 2004, **41**(4):362-370.
- Wheeler SS, Langevin S, Woods L, Carroll BD, Vickers W, Morrison SA, Chang GJ, Reisen WK, Boyce WM: **Efficacy of three vaccines in protecting Western Scrub-Jays (*Aphelocoma californica*) from experimental infection with West Nile virus: implications for vaccination of Island Scrub-Jays (*Aphelocoma insularis*).** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011, **11**(8):1069-1080.
- Wodak E, Richter S, Bago Z, Revilla-Fernandez S, Weissenböck H, Nowotny N, Winter P: **Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009.** *Vet Microbiol* 2011, **149**(3-4):358-366.
- Wünschmann A, Shivers J, Carroll L, Bender J: **Pathological and immunohistochemical findings in American crows (*Corvus brachyrhynchos*) naturally infected with West Nile virus.** *J Vet Diag Invest* 2004, **16**(4):329-333.
- Wünschmann A, Ziegler A: **West Nile virus-associated mortality events in domestic chukar partridges (*Alectoris chukar*) and domestic Impeyan pheasants (*Lophophorus impeyanus*).** *Avian Dis* 2006, **50**(3):456-459.
- Young JA, Jefferies W: **Towards the conservation of endangered avian species: a recombinant West Nile Virus vaccine results in increased humoral and cellular immune responses in Japanese Quail (*Coturnix japonica*).** *PLoS One* 2013, **8**(6):e67137.
- Zhang Z, Wilson F, Read R, Pace L, Zhang S: **Detection and characterization of naturally acquired West Nile virus infection in a female wild turkey.** *J Vet Diag Invest* 2006, **18**(2):204-208.