

Patogenia de la infección con virus de influenza aviar de alta y de baja patogenicidad en perdiz roja (*Alectoris rufa*)

KATERI BERTRAN^{1*}, ROSER DOLZ¹, ANTONI RAMIS^{1,2}, ELISA PÉREZ³, ÚRSULA HOFFLE³, ROSA VALLE¹, RAQUEL RIVAS¹, NÚRIA BUSQUETS¹, NATÀLIA MAJÓ^{1,2}

¹ Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), 08193, Barcelona, España

² Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Barcelona

³ Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC)

*e-mail: kateri.bertran@cresa.uab.cat

RESUMEN

En el presente estudio, se realizó una infección experimental con virus de influenza aviar de alta (HPAIV) y de baja (LPAIV) patogenicidad en perdices, con el objetivo de estudiar signos clínicos, lesiones macroscópicas y microscópicas, distribución viral en tejido y excreción viral. Cincuenta y cinco perdices rojas (*Alectoris rufa*) se inocularon por vía intranasal con un HPAIV subtipo H7N1 (A/Chicken/Italy/5093/1999) y un LPAIV subtipo H7N9 (A/Anas crecca/Spain/1460/2008). Diariamente, se evaluaron signos clínicos, y se recogieron hisopos orofaríngeos y cloacales, y muestras de pulpa de pluma de todos los animales para detectar excreción viral mediante real time RT-PCR (RRT-PCR). A 3, 5, 10 y 15 dpi, se eutanasiaron tres animales de cada grupo de infección. Se evaluaron lesiones macroscópicas, y se recogieron muestras de tejido para estudios histopatológicos.

A 3 dpi, las aves infectadas con HPAIV mostraron leve depresión y plumas erizadas. La mortalidad empezó a 4 dpi. A 8 dpi, los animales que habían sobrevivido mostraron grave sintomatología nerviosa. La presencia de antígeno viral en tejidos y la excreción viral se confirmaron mediante inmunohistoquímica y RRT-PCR, respectivamente. No se observaron signos clínicos ni lesiones histopatológicas en los animales infectados con LPAIV, y además se detectó una excreción viral errática en algunas de las aves. Este estudio demuestra que A/Chicken/Italy/5093/1999 subtipo H7N1 (HPAIV) causa grave enfermedad y mortalidad elevada en la perdiz roja. Contrariamente, A/Anas crecca/Spain/1460/2008 subtipo H7N9 (LPAIV) no produce enfermedad evidente en esta especie aviar.

Palabras clave: Influenza aviar, patogenia, perdiz roja

Pathogeny of infection by high- and low-pathogenicity avian influenza virus in red-legged partridges (*Alectoris rufa*)

SUMMARY

The present paper describes an experimental infection of partridges using high- and low-pathogenicity avian influenza viruses (HPAIV/LPAIV), in order to analyse clinical symptoms, macroscopic and microscopic lesions, virus tissue distribution and virus excretion. The experiment consisted of the intranasal inoculation of fifty five red-legged partridges (*Alectoris rufa*) with the H7N1 subtype of an HPAIV virus (A/Chicken/Italy/5093/1999) or the H7N9 subtype of an LPAIV virus (A/Anas crecca/Spain/1460/2008). Every day, an assessment of clinical symptoms was made and oropharyngeal and cloacal swabs as well as feather pulp samples of every animal were collected in order to detect virus excretion using real-time RT-PCR (RRT-PCR).

On dpi 3, 5, 10 and 15, three animals in each infection group were euthanased. Macroscopic lesions were analysed and tissue samples were collected for histopathological study. On dpi 3, birds infected with the HPAIV showed a mild depression and bristled feathers. Mortality started on dpi 4. On dpi 8, the surviving animals showed a severe nervous symptomatology. The presence of viral antigens in tissue and virus excretion were confirmed by immunohistochemistry and RRT-PCR, respectively. No clinical symptoms or histopathological lesions were observed in animals infected with LPAIV and some birds showed an erratic virus excretion. This study confirms that the A/Chicken/Italy/5093/1999 subtype H7N1 (HPAIV) causes severe disease and high mortality rate in red-legged partridges. On the other hand, the A/Anas crecca/Spain/1460/2008 subtype H7N9 (LPAIV) does not cause any apparent disease in this avian species.

Keywords: Avian influenza, pathogenicity, red-legged partridge

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, la influenza aviar se ha convertido en uno de los desafíos más importantes emergidos de un reservorio animal (3, 4). El potencial de los virus de influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP) de causar una pandemia, concretamente de los subtipos H5N1, representa una amenaza tanto para las aves de producción como para las aves salvajes y el hombre. Las aves acuáticas están ampliamente reconocidas como reservorio natural de los virus de influenza A (2). Intermitentemente, las aves salvajes transmiten virus de influenza aviar de baja patogenicidad (IABP) a las poblaciones de aves de producción, causando enfermedad leve y reducida mortalidad. No obstante, algunos virus de subtipo H5 o H7 pueden mutar y convertirse en virus de IAAP, produciendo enfermedad sistémica grave y elevada mortalidad.

Recientemente se ha demostrado que los virus de IAAP pueden transmitirse directamente de las aves salvajes a las aves domésticas de producción (1). Hasta el momento, existen pocos estudios sobre la capacidad de los virus de influenza A para replicarse en especies menores de producción, como codornices, faisanes o perdices (5, 7). Estas especies tienen interés de estudio, no solo porque forman parte de la fauna salvaje, sino también porque se crían en regímenes extensivos o semi-extensivos con fines cinegéticos, la cual cosa permite el contacto con las aves salvajes de un determinado lugar.

Sorprendentemente, hasta el momento no hay estudios que demuestren la susceptibilidad a la infección y la patogenicidad de la influenza aviar en la perdiz roja (*Alectoris rufa*), la gallinácea más abundantemente criada con fines cinegéticos. En consecuencia, existe la necesidad de investigar la dinámica de infección de la influenza aviar en especies menores de producción, con el objetivo de determinar el papel epidemiológico que estas especies pueden jugar.

En el presente estudio, se llevó a cabo una infección experimental con virus de IAAP y IABP en perdices rojas con el fin de estudiar signos clínicos, lesiones macro y microscópicas, distribución del virus en los tejidos y excreción vírica. Los resultados de este estudio esclarecen el rol que la perdiz roja tiene en la epidemiología de esta enfermedad, y determina la importancia de los programas de vigilancia en esta especie.

MATERIAL Y MÉTODOS

Virus

Se utilizaron dos cepas de virus: un virus de IAAP subtipo H7N1 (A/Chicken/Italy/5093/1999) y un virus de IABP subtipo H7N9 (A/Anas crecca/Spain/1460/2008). Los virus se produjeron en huevos de pollo SPF de nueve días de edad, por seis pases en el caso de la cepa H7N1 y por un pase en el caso de la cepa H7N9.

En ambos casos, el fluido alantoideo se recogió a las 48 horas post- inoculación, se alicuotó y se diluyó con PBS para su titulación. La ELD (*egg letal dose*) 50% para la cepa H7N1, y la EID (*egg infective dose*) 50% para la cepa H7N9 se determinaron por el método de Reed and Muench (8).

Animales

En este estudio se usaron cincuenta y cinco perdices rojas (*Alectoris rufa*) de dos meses de edad. Los animales se criaron en las granjas experimentales del IREC (Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos), donde se les recogieron muestras de suero para comprobar que eran serológicamente negativos mediante ELISA de competición (ID-VET, Montpellier, France) y test de inhibición de la hemaglutinación para subtipo H7. Una vez en el CReSA (Centre de Recerca en Sanitat Animal), las aves se alojaron en las instalaciones de nivel de bioseguridad 3 (NBS-3), y después de un periodo de aclimatación de una semana, se repartieron en cinco grupos experimentales en diferentes aisladores negativamente presurizados.

Diseño experimental

La **Tabla 1** resume el diseño experimental de este estudio. Para cada virus, se usaron dos grupos experimentales de doce animales cada uno: un grupo (A) se usó para evaluar la mortalidad y la transmisibilidad de los virus, así como la excreción vírica. El otro grupo (B) se usó para los estudios patológicos. Un quinto grupo (3) de ocho perdices se usó como grupo control.

Los dos grupos infectados con virus de IAAP (1A y 1B) se inocularon por vía intranasal con 10^6 ELD50 de la cepa H7N1 en un volumen total de 0.05 ml de PBS. En el grupo 1A, cuatro de las doce aves no se inocularon sino que se introdujeron en el aislador una hora después de la inoculación; estos animales se refirieron como animales contacto.

Los dos grupos infectados con virus de IABP (2A y 2B) se inocularon por vía intranasal con 10^5 EID50 de la cepa H7N9 en un volumen total de 0.16 ml de PBS. En el grupo 2A, cuatro de las doce aves no se inocularon sino que se introdujeron en el aislador una hora después de la inoculación; estos animales se refirieron como animales contacto. Los animales del grupo control se inocularon por vía intranasal con 0.05 ml de PBS.

Tabla 1. Grupos experimentales de la infección en perdices rojas de los virus de influenza aviar A/Chicken/Italy/5093/1999 (H7N1) y A/Anas crecca/Spain/1460/2008 (H7N9)

GRUPOS	INÓCULO	TÍTULO	VÍA	Nº ANIMALES
Grupo 1 A	H7 N1	10 ⁶ ELD ₅₀	intranasal	12
Grupo 1 B				(8 inoculados + 4 contactos)
Grupo 2 A	H7 N9	10 ⁶ EID ₅₀	intranasal	12
Grupo 2 B				(8 inoculados + 4 contactos)
Grupo 3	PBS	----	intranasal	8

Muestreo

Diariamente se monitearon los signos clínicos de todos los animales siguiendo la puntuación establecida por la OIE (Chapter 2.7.12, May 2005): sanos (0), enfermos (1), gravemente enfermos (2), moribundos o muertos (3), en función del número de signos presente. Durante los diez primeros días post-infección (dpi), a 12 dpi y a 15 dpi, se recogieron hisopos orofaríngeos y cloacales, y muestras de pulpa de pluma de los animales de los grupos 1A, 2A y 3, para medir la excreción vírica. La mortalidad y el tiempo medio de muerte (TMM) se calcularon también en estos grupos. A 3, 5, 10 y 15 dpi, tres animales de los grupos 1B y 2B, y dos animales del grupo 3, se sacrificaron para evaluar lesiones macroscópicas y recoger muestras con el fin de realizar el estudio patológico y serológico. Los animales muertos y los que se sacrificaron por razones éticas también se necropsiaron. Se recogieron muestras de sangre en tubos sin anticoagulante de los animales eutanasiados a 0, 6, 8, 10 y 15 dpi y de los animales éticamente sacrificados. Las muestras para evaluar excreción vírica y las muestras de suero se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Histopatología

Las necropsias y la toma de muestras se realizaron según un protocolo estandarizado, y los tejidos se procesaron según el protocolo convencional de tinción con hematoxilina-eosina (H/E). Se examinaron los siguientes tejidos: esófago, buche, proventrículo, molleja, duodeno, yeyuno-íleo, ciego/tonsila cecal, colon, recto, páncreas, hígado, riñón, glándula adrenal, gónadas (testículos o ovarios), cornete nasal, tráquea, pulmón, corazón, músculo del pecho, piel, medula ósea, bazo, bolsa de Fabricio, timo, encéfalo, medula espinal y nervio ciático.

Detección de virus de influenza aviar mediante inmunohistoquímica

Se realizó una técnica basada en el sistema Avidina-biotina complejo inmunoperoxidasa (ABC) como previamente se había descrito (9). Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo monoclonal comercial de ratón contra la nucleoproteína del virus de influenza A (IgG2a, Hb65, ATCC). Se usó la siguiente puntuación para medir el grado de positividad en los tejidos: ninguna célula positiva (-), células positivas aisladas (+), grupos aislados de células positivas (++) , positividad diseminada (+++).

Cuantificación de virus de influenza aviar mediante RT-PCR a tiempo real (RRT-PCR)

La cuantificación de RNA vírico mediante qRT-PCR se llevó a cabo a partir de los hisopos orofaríngeos y cloacales, y de las muestras de pulpa de pluma. Se realizó la extracción de RNA vírico con el mini kit QIAamp (Qiagen, Valencia, California) y se amplificó el fragmento de 99 bp del gen *M* como previamente se había descrito (10), aunque con pequeñas modificaciones para poder determinar el número de moléculas de RNA de virus de influenza aviar.

Serología

Se llevó a cabo un test de ELISA de competición (C-ELISA) para determinar los títulos de anticuerpo de influenza aviar mediante un kit comercial (ID-VET, Montpellier, France), siguiendo las instrucciones del fabricante.

RESULTADOS

Signos clínicos

Únicamente se observaron signos clínicos en las perdices infectadas con virus de IAAP. Cabe destacar que no se detectaron diferencias significativas entre los animales inoculados y los contactos, tanto en gravedad como en momento de aparición de la sintomatología. Los signos empezaron a 3 dpi, y consistieron en depresión, inactividad y plumas erizadas (**Figura A**). A 8 dpi, las perdices que habían sobrevivido presentaron signos neurológicos graves como tortícolis, incoordinación y temblores de cabeza. La mortalidad en los animales infectados con el virus de IAAP subtipo H7N1 resultó en un 100%, entre los 4 y 9 dpi, siendo el TMM 6.42 dpi. No se observaron signos clínicos ni mortalidad en los animales infectados con virus de IABP ni en los animales del grupo control.

Macroscopía

Tan solo los animales infectados con virus de IAAP mostraron lesiones directamente relacionadas con influenza aviar. Una vez más, no hubo diferencias entre aves inoculadas y contactos por lo que se refiere tanto a gravedad como a momento de aparición de las lesiones. A 3 dpi, se observaron hemorragias petequiales en la superficie de los músculos y atrofia tímica, aunque las lesiones más significativas se encontraron en riñón, y se caracterizaron por palidez parenquimal, marcado patrón lobular en la superficie y acumulación de uratos en los uréteres (**Figura 1B**). No se observaron lesiones significativas en las perdices infectadas con virus de IABP ni en los animales del grupo control.

Figura 1. (A) Perdiz roja con signos de depresión y plumas erizadas, 3 dpi.
(B) Lesiones renales en una perdiz roja, 6 dpi.



A

B

Histopatología

Únicamente se observaron lesiones en los animales infectados con virus de IAAP, tanto en los inoculados como en los contactos. El momento de aparición de las lesiones fue a los 3 dpi, siendo los órganos más afectados el riñón, la glándula adrenal, los folículos de las plumas y el sistema nervioso central (encéfalo y medula espinal). No se observaron lesiones significativas en las aves infectadas con virus de IABP ni en los animales del grupo control.

Sistema digestivo, páncreas e hígado. Se observaron áreas multifocales de degeneración y necrosis en las glándulas gástricas y en las células de la capa muscular externa de la molleja, a veces con presencia de infiltrado inflamatorio heterofílico (**Figura 2A**). En el páncreas se observaron áreas multifocales a coalescentes de necrosis en los acinos pancreáticos, mientras que en el hígado se detectó un infiltrado heterofílico perivascular y necrosis de hepatocitos aislados.

Sistema urogenital. Las lesiones en riñón y en glándula adrenal fueron las más importantes del estudio, tanto en intensidad como en frecuencia. En el riñón se observó necrosis multifocal de los túbulos del córtex renal (**Figura 3A**), y en la glándula adrenal áreas multifocales a coalescentes de necrosis y apoptosis de las células corticotrópicas y corticotróficas (**Figura 3A**).

Sistema respiratorio. En los cornetes nasales se presentaron áreas de degeneración y necrosis especialmente del epitelio respiratorio y del olfatorio (**Figura 4A**). Por otro lado, en la tráquea se observaron áreas multifocales de necrosis en el epitelio pseudoestratificado, y en el pulmón un incremento de la celularidad en los capilares aéreos de los parabronquios, debido sobre todo a la presencia de macrófagos y de heterófilos.

Sistema cardiovascular y músculo pectoral. Se observaron áreas multifocales de necrosis en miocardio, así como también en músculo pectoral. Asimismo, se observó la presencia de daño vascular en el endotelio de los vasos de pequeño calibre y de los capilares de muchos órganos.

Figura 2. Molleja, 3 dpi;

(A) áreas focales de degeneración y necrosis de las glándulas gástricas, H/E.

(B) positividad en células epiteliales de las glándulas gástricas, IHQ.

2A



2B

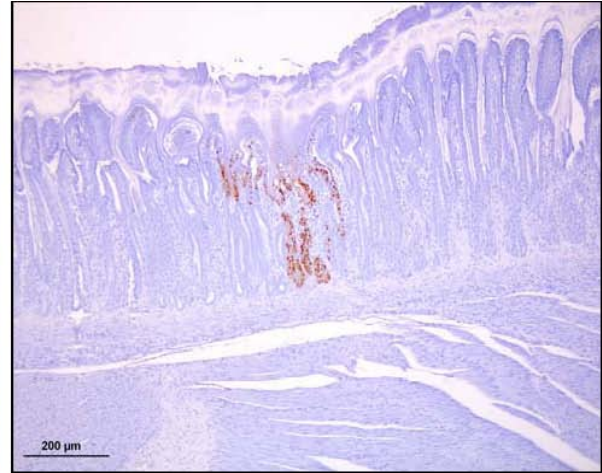
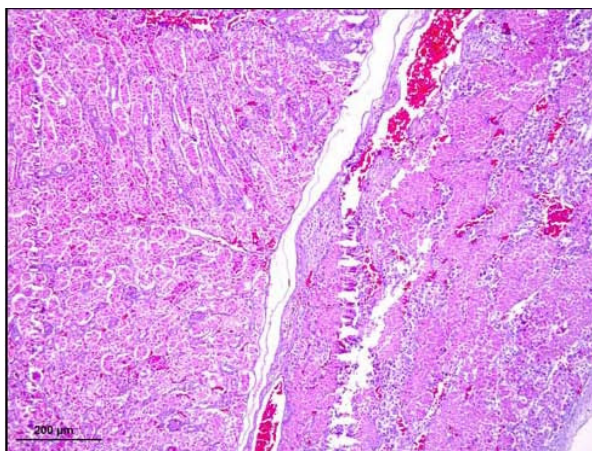


Figura 3. Riñón y glándula adrenal, 5 dpi;

(A) necrosis multifocal de los túbulos del córtex renal, áreas multifocales a coalescentes de necrosis y apoptosis de la glándula adrenal, H/E.

(B) positividad en células tubulares del córtex renal, y en células corticotrópicas y corticotróficas de la glándula adrenal, IHQ.

3A



3B

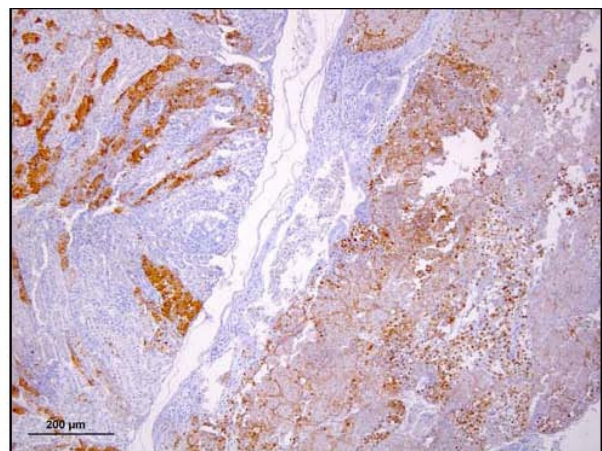
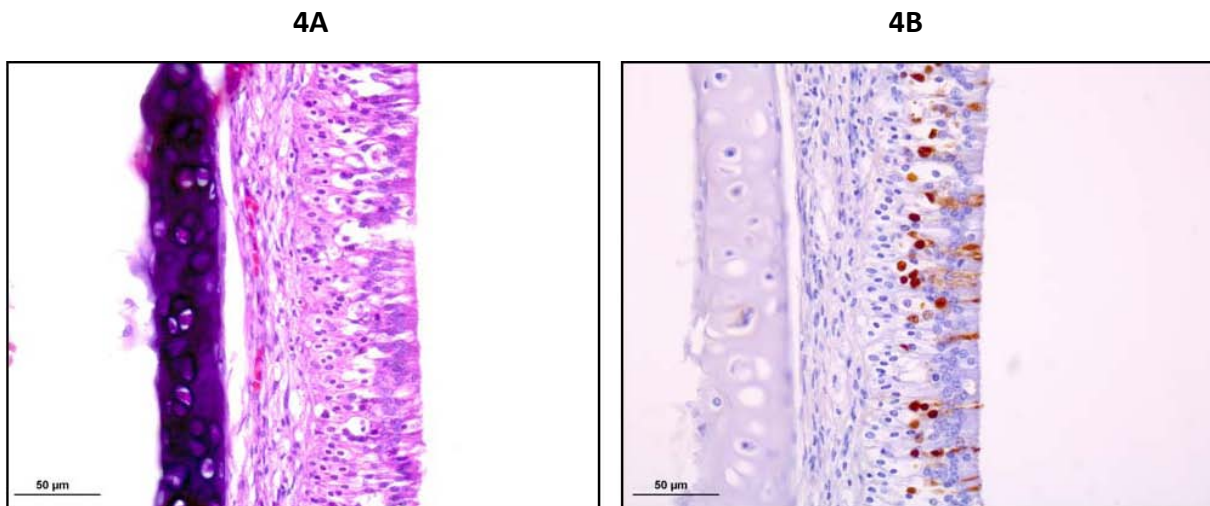


Figura 4. Cornete nasal, 6 dpi;

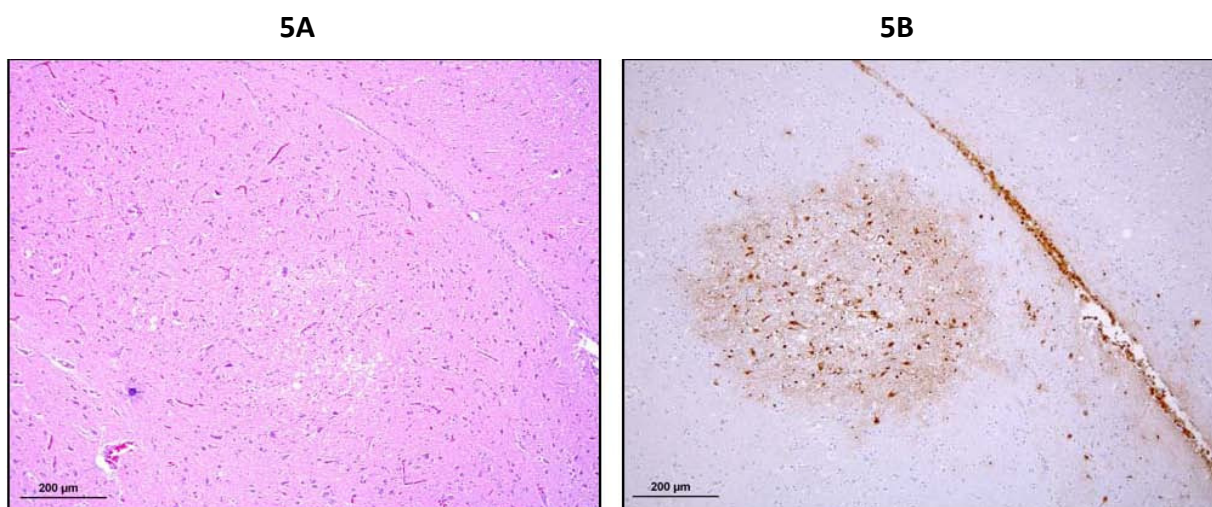
(A) necrosis de las células del epitelio olfatorio, H/E.

(B) positividad en células del epitelio olfatorio, IHQ.

**Figura 5. Encéfalo, 5 dpi;**

(A) áreas focales de malacia, H/E.

(B) positividad en neuronas, células endimarias y células gliales, IHQ.



Piel. La principal lesión microscópica encontrada en la piel se observó en los folículos de las plumas, donde se detectó la presencia de necrosis en las células del collar epidermal.

Sistemas hematopoiético y linfático. Se observaron lesiones necrotizantes en el epitelio pseudoestratificado de la bolsa de Fabricio, así como también leve atrofia tímica.

Sistema nervioso. Tanto en encéfalo como en medula espinal se detectaron lesiones significativas. En encéfalo (**Figura 5A**), la lesión más importante consistió en áreas multifocales de malacia caracterizadas por espongiosis del neurópilo, picnosis y cromatolisis central de las neuronas, sateliosis, necrosis de las células gliales y ligera gliosis. También se observó necrosis en las células endimarias de los ventrículos y de los plexos coroidales, y cromatolisis en las neuronas de Purkinje del cerebelo. Se detectaron lesiones muy similares en la medula espinal, especialmente alrededor del canal medular.

Detección de virus de influenza aviar mediante inmunohistoquímica

Solamente se detectó antígeno vírico en los animales infectados con virus de IAAP, y sobre todo en molleja, páncreas, riñón, glándula adrenal, folículos de las plumas y sistema nervioso central (**Figuras 2B, 3B, 4B, 5B**). Además, se observó positividad en macrófagos aislados y en células endoteliales de casi todos los órganos. Los resultados se resumen en la **Tabla 2**.

Cuantificación de virus de influenza aviar mediante RT-PCR a tiempo real (RRT-PCR)

Se midió la excreción vírica mediante RRT-PCR a partir de los hisopos orofaríngeos y cloacales, y de las muestras de pulpa de pluma. En cuanto a los animales inoculados con virus de IAAP (**Figura 6A**), se detectaron niveles considerables de virus desde 1 dpi hasta el final del experimento en todas las muestras, especialmente en pulpa de pluma. Por lo que se refiere a las aves contacto (**Figura 6B**), la excreción fue de unos niveles muy similares a los de los animales inoculados, aunque ésta empezó un día más tarde. En relación a las aves inoculadas con virus de IABP (**Figura 6C**), en algunas perdices se observó excreción vírica por vía orofaríngea entre 1 y 3 dpi (solo un animal mostró excreción hasta 8 dpi), y en un caso se detectó excreción cloacal a 1 dpi. Los niveles observados fueron menores que los de los animales infectados con virus de IAAP. Cabe destacar que no se detectó excreción por pulpa de pluma en los animales inoculados con virus de IABP, ni tampoco en los animales contacto por ninguna vía.

Tabla 2. Distribución vírica determinada mediante inmunohistoquímica, en tejidos de perdices rojas inoculadas por vía intranasal con virus de IAAP subtipo H7N1 (A/Chicken/Italy/5093/1999).

TEJIDO	3 dpi	6 dpi	8 dpi	TIPO DE CÉLULA PREDOMINANTE
Esófago	-	-	-	-
Buche	-	+	-	Células del epitelio escamoso poliestratificado
Proventrículo	-	+	-	Células epiteliales de las glándulas gástricas
Molleja	+	++	+	Células epiteliales de las glándulas gástricas, células de la musculares externa
Duodeno	-	-	-	-
Yeyuno-íleo	-	-	-	-
Ciego/Tonsila cecal	-	+	-	Células epiteliales de las glándulas gástricas, células de la musculares externa
Colon	-	-	-	-
Recto	-	-	-	-
Páncreas	+	+	+	Células acinares, células endoteliales
Hígado	+	+	+	Células de Kupffer, células endoteliales
Riñón	++	+++	++	Células tubulares, células endoteliales
Glándula adrenal	+	+++	+++	Células corticotrópicas, células corticotróficas
Gónadas	-	-	+	Células epiteliales del oviducto
Cornete nasal	-	+	+	Células del epitelio olfatorio, Células del epitelio respiratorio, células epiteliales de los senos infraorbitarios, glándulas salivares y nasales
Tráquea	+	-	+	Células del epitelio pseudoestratificado
Pulmón	+	+	+	Células de los capilares aéreos, macrófagos, células endoteliales
Miocardio	-	+	+	Miocardiocitos, células endoteliales
Músculo pectoral	-	+	-	Miocitos, células endoteliales
Piel	-	++	+	Células epiteliales del collar epidermal del folículo de la pluma, células endoteliales, pulpa
Medula ósea	-	-	-	-
Bazo	+	+	+	Macrófagos, células endoteliales
Bolsa de Fabricio	-	+	-	Macrófagos, células epiteliales
Timo	-	-	-	-
Encéfalo	-	++	+++	Neuronas, células ependimarias, células gliales
Medula espinal	-	+	++	Neuronas, células ependimarias, células de las leptomeninges
Nervio ciático	-	-	-	-

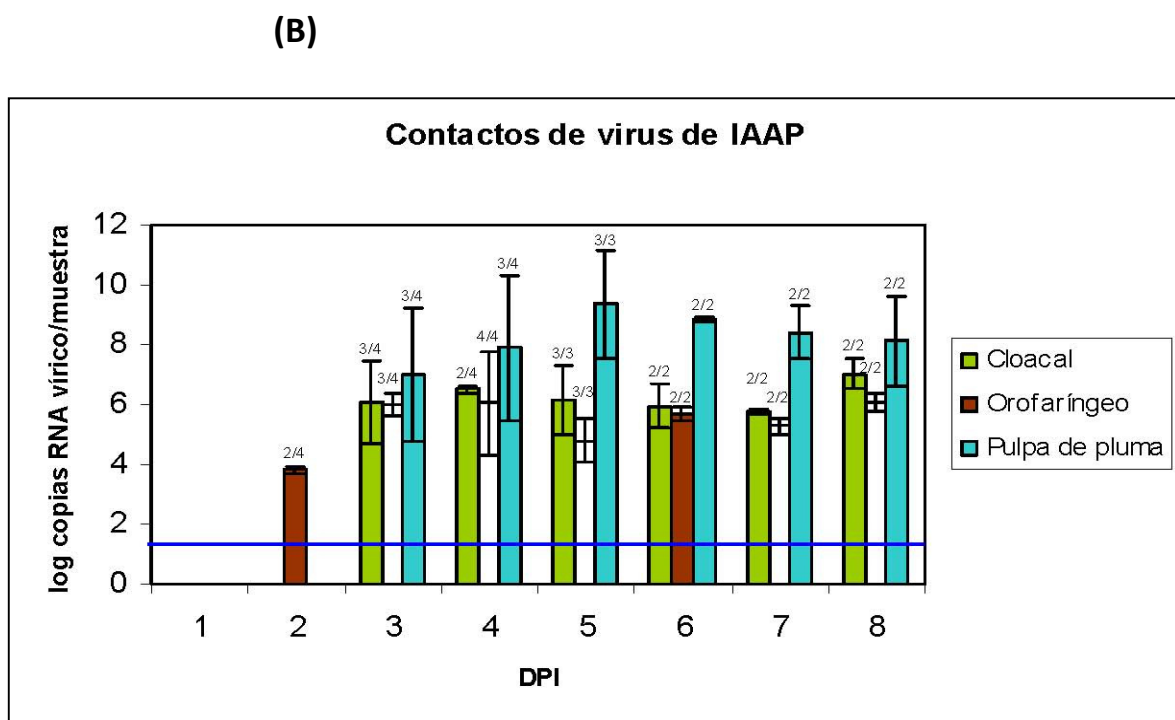
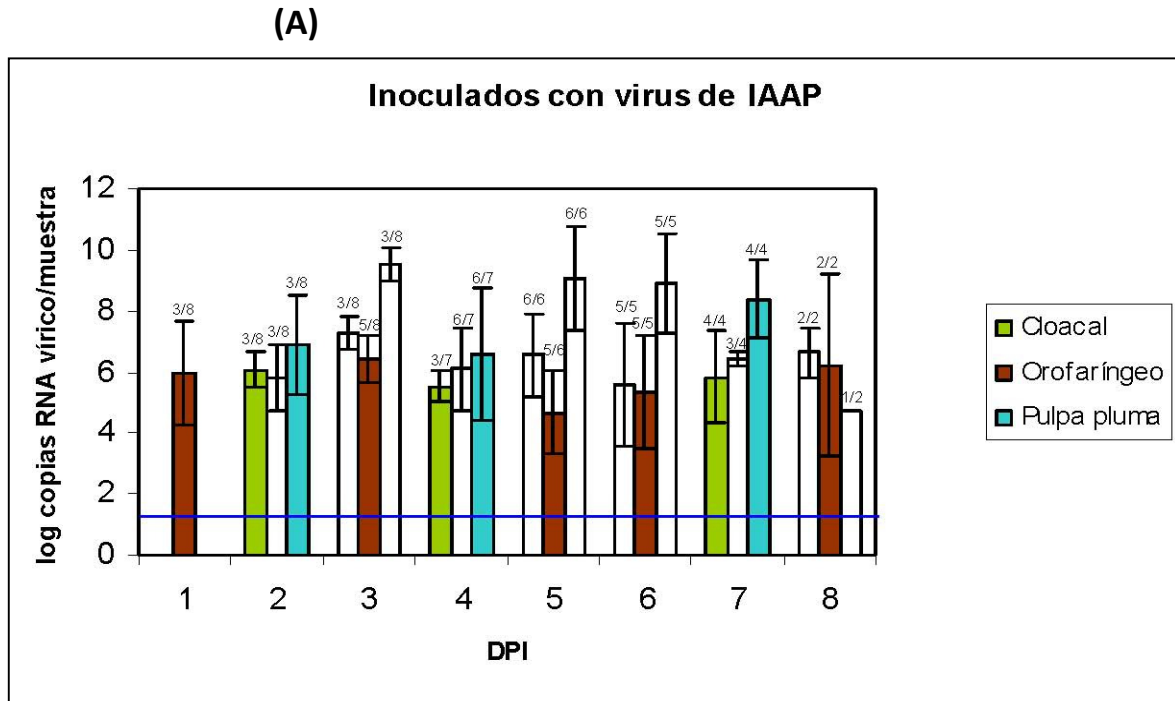
- = no positividad; + = células positivas aisladas; ++ = grupos de células positivas aisladas; +++ = positividad diseminada

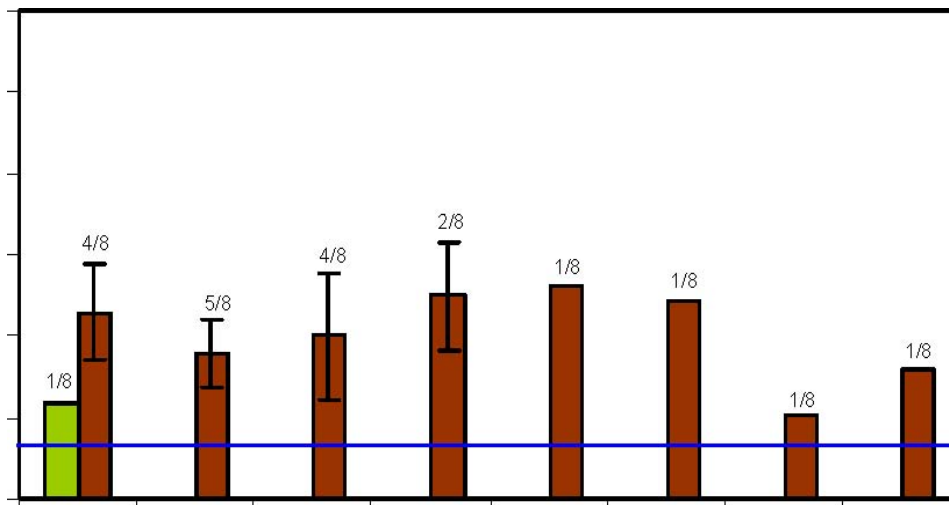
Figura 6. Excreción vírica (log copias de RNA vírico/muestra) detectada por RRT-PCR durante 8 días en hisopos orofaríngeos, cloacales y pulpa de pluma de perdices rojas infectadas con virus de IAAP subtipo H7N1 (A/Chicken/Italy/5093/1999) y virus de IABP subtipo H7N9 (A/Anas crecca/Spain/1460/2008). Las ratios indican el número de animales que excretaron sobre el total. El nivel de detección está indicado.

(A) Perdices inoculadas por vía intranasal con H7N1,

(B) Perdices contacto de H7N1,

(C) Perdices inoculadas por vía intranasal con H7N9.



(C) Inoculados con virus de IABP**Serología**

Se recogieron muestras de sangre para determinar el título de anticuerpos mediante un C-ELISA. Las aves infectadas con virus de IAAP empezaron a seroconvertir a los 6 dpi. Cabe destacar que a 8 dpi, de los cuatro animales que quedaban vivos, todos ellos eran seropositivos, y dos eran animales contacto. Por el contrario, tres de ocho perdices infectadas con virus de IABP mostraron seroconversión a los 15 dpi; precisamente estos animales fueron los que excretaron virus de manera más consistente. Ninguno de los animales contacto de virus de IABP fue seropositivo.

DISCUSIÓN

La perdiz roja (*Alectoris rufa*) es la gallinácea más abundantemente criada en régimen extensivo, sin embargo no existen aún estudios que evidencien su función dentro de la epidemiología de la influenza aviar. Con el objetivo de esclarecer este aspecto, se realizó una infección experimental con un virus de IAAP subtipo H7N1 (A/Chicken/Italy/5093/1999) y un virus de IABP subtipo H7N9 (A/Anas crecca/Spain/1460/2008).

Por lo que se refiere a los animales infectados con virus de IAAP subtipo H7N1, se reprodujo la enfermedad con signos clínicos graves, de carácter sistémico y con una mortalidad del 100%. Estos resultados coinciden con los obtenidos en infecciones de otras especies gallináceas (6, 7, 11). Además, se consiguió demostrar una transmisión vírica eficiente entre animales gracias a la presencia de signos clínicos en animales contacto, a la seroconversión de animales contacto y a la excreción vírica detectada también en estos animales.

Nuestros resultados nos llevan a concluir que la perdiz roja podría jugar un papel importante en la epidemiología de la influenza aviar causada por virus de IAAP. Por ello, sugerimos que se incluya la perdiz como especie centinela debido a la evidente sintomatología y la elevada mortalidad, por la cual cosa convendría prestarle una mayor atención en los programas de vigilancia pasiva. Por otro lado, esta especie podría llegar a contribuir a la expansión de virus en caso de un brote causado por virus de IAAP, ya que los niveles de excreción detectados han sido relevantes y durante un periodo prolongado de tiempo.

En cuanto los animales infectados con el virus de IABP subtipo H7N9, éstos no mostraron enfermedad evidente, hecho que concuerda con los resultados obtenidos en otras infecciones (5). Asimismo, no se demostró una transmisión eficiente entre animales, contrariamente a lo observado con las aves infectadas con virus de IAAP. Estos resultados nos llevan a sugerir que la perdiz roja no jugaría un papel importante como reservorio en la influenza aviar causada por virus de IABP.

REFERENCIAS

1. **ALEXANDER, D.J. (2007).** An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* 25: 5637-5644.
2. **ALEXANDER D.J. (2000).** A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 74: 3-1.
3. **CAPUA, I., ALEXANDER, D.J. (2006).** The challenge of avian influenza to the veterinary community. *Avian Pathol* 35: 189-205.
4. **CAPUA, I., ALEXANDER, D.J. (2004):** Avian influenza: recent developments. *Avian Pathol* 33: 393-404.
5. **HUMBERD, J., GUAN, Y., WEBSTER, R.G (2006).** Comparison of the replication of influenza A viruses in Chinese ring-necked pheasants and chukar partridges. *J Virol* 80: 2151-2161.
6. **JEONG, O.M., KIM, M.C., KIM, M.J., KANG, H.M., KIM, H.R., KIM. Y.J. (2009).** Experimental infection of chickens, ducks and quails with the highly pathogenic H5N1 avian influenza virus. *J Vet Sci* 10: 53-60.
7. **PERKINS, L.E., SWAYNE, D.E. (2001).** Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Vet Pathol* 38: 149-164.
8. **REED, L.J., MUENCH, H. (1938).** A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 27: 493-497.
9. **RIMMELZWAAN, G.F., KUIKEN, T., van AMERONGEN, G., BESTEBROER. T.M., FOUCHIER. R.A, OSTERHAUS, A.D. (2001).** Pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection in a primate model. *J Virol* 75: 6687-6691.
10. **SPACKMAN E, SENNE DA, MYERS TJ, BULAGA LL, GARBER LP, PERDUE ML. (2002).** Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol.*, 40: 3256-3260.
11. **van RIEL, D., van den BRAND, J., MUNSTER, V.J., BESTEBOER, T.M., FOUCHIER, R.A., OSTERHAUS A. (2009).** Pathology and Virus Distribution in Chickens Naturally Infected with Highly Pathogenic Avian Influenza a Virus (H7N7) during the 2003 Outbreak in the Netherlands. *Vet Pathol* 2009.

