



TESIS DOCTORAL

TÍTULO

Circulación del virus del Nilo occidental y otros flavivirus en Extremadura

NOMBRE Y APELLIDOS DE LA AUTORA

Dña. Fátima Guerrero Carvajal

PROGRAMA DE DOCTORADO

Salud Pública y Sanidad Animal

Conformidad de la directora y los codirectores

Dra. Eva María Frontera Carrión

Dra. María Martín Cuervo

Dr. Daniel Bravo Barriga

Esta tesis cuenta con la autorización de la directora y los codirectores de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

AÑO DE LECTURA

2023

TESIS DOCTORAL

Circulación del virus del Nilo occidental y otros flavivirus en Extremadura



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

**Programa de Doctorado Salud Pública y
Animal**

Facultad de Veterinaria (Cáceres)

Esta tesis cuenta con la autorización de la directora y codirectores de la misma: “**D^a EVA MARÍA FRONTERA CARRIÓN, D^a MARÍA MARTÍN CUERVO y D^o DANIEL BRAVO BARRIGA**, y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura”.

AUTORA: D^{ña}. FÁTIMA GUERRERO CARVAJAL

AÑO DE LECTURA: 2023



DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

Campus Universitario

Avenida de la Universidad, s/n

E-10071- CÁCERES

Teléfonos: +(34) 927 25 71 30

Fax: +(34) 927 25 71 30

Conformidad de los directores:

Eva María Frontera Carrión, Profesora Titular del Área de Parasitología, del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura.

Informa:

Que la graduada en Veterinaria por la Universidad de Extremadura Fátima Guerrero Carvajal ha realizado en esta área, bajo mi dirección y junto con la supervisión de la Dra. María Martín Cuervo y el Dr. Daniel Bravo Barriga como codirectores, el presente trabajo de investigación titulado “Circulación del virus del Nilo occidental y otros flavivirus en Extremadura”, con el que opta al título de Doctor.

Que en todo momento ha demostrado gran rigor científico en el desarrollo de esta memoria, utilizando todos los medios puestos a su alcance para la consecución de los objetivos marcados.

Por todo lo cual, y para que conste en su memoria de doctorado, firmo, junto con los codirectores el presente informe en Cáceres, a 28 de febrero de 2023.

Director:

Codirectores:

Dra. Eva María Frontera Carrión

Dra. María Martín Cuervo

Dr. Daniel Bravo Barriga

La presente Tesis Doctoral está elaborada en el formato de compendio de publicaciones, según el Artículo 33 de la Resolución de 14 de diciembre de 2021, por el que se aprueba la Normativa Reguladora de los Estatutos de Doctorado (DOE de 28 de diciembre de 2021), e incluyen los siguientes artículos, publicados en revistas científicas internacionales indexadas en el Journal Citation Reports (JCR):

1. “Serological evidence of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids from Western Spain”.
Fátima Guerrero-Carvajal, Daniel Bravo-Barriga, María Martín-Cuervo, Pilar aguilera-Sepúlveda, Martina Ferraguti, Miguel Ángel Jiménez-Clavero, Francisco Llorente, Juan Manuel Alonso, Eva Frontera.
Transboundary and Emerging Diseases, 2021; 68(3)
DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13810>
Factor de impacto, cuartil y categoría: 4.521 / Q1 / Veterinary sciences
Posición categoría: 7/145

2. “West Nile and Usutu virus infections in wild birds admitted to rehabilitation centres in Extremadura Western Spain, 2017-2019”.
Daniel Bravo-Barriga, Pilar aguilera-Sepúlveda, Fátima Guerrero-Carvajal*, Francisco Llorente, David Reina, J. Enrique Pérez-Martín, Miguel Ángel Jiménez-Clavero, Eva Frontera.
Veterinary Microbiology, 2021; 255:109020
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109020>
Factor de impacto, cuartil y categoría: 3.246 / Q1 / VETERINARY SCIENCES
Posición categoría: 15/145

3. “Circulation of zoonotic flaviviruses in wild passerine birds in Western Spain”.
Alfonso Marzal, Martina Ferraguti, Jaime Muriel, Sergio Magallanes, Juan Antonio Ortiz, Luz García-Longoria, Daniel Bravo-Barriga, Fátima Guerrero-Carvajal, Pilar Aguilera-Sepúlveda, Francisco Llorente, Florentino de Lope, Miguel Ángel Jiménez-Clavero, Eva Frontera.
Veterinary Microbiology, 2022; 268:109399
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109399>
Factor de impacto, cuartil y categoría: 3.246 / Q1 / VETERINARY SCIENCES
Posición categoría: 15/145

4. "Identification of Usutu Virus Africa 3 lineage in a survey of mosquitoes and birds from urban areas Western Spain".

Daniel Bravo-Barriga, Martina Ferraguti*, Sergio Magallanes, Pilar Aguilera-Sepúlveda, Francisco Llorente, Elisa Pérez-Ramírez, Ana Vázquez, Fátima Guerrero-Carvajal, María Paz Sánchez-Seco, Miguel Ángel Jiménez-Clavero, Carlos Mora-Rubio, Alfonso Marzal, Eva Frontera, Florentino de Lope

Transboundary and Emerging Diseases, 2023; 6893677

DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/6893677>

Factor de impacto, cuartil y categoría: 4.521 / Q1 / Veterinary sciences

Posición categoría: 7/145

En el apartado "otros trabajos publicados", se recoge el siguiente artículo de divulgación, publicado en la revista del Colegio Oficial de Veterinarios de Badajoz, incluyendo los resultados de la vigilancia entomológica de mosquitos realizada en zonas urbanas de Cáceres y Badajoz entre 2021-2022, y financiada por esta entidad.

1. Diversidad y distribución de especies de mosquitos en zonas urbanas y periurbanas de las ciudades de Badajoz y Cáceres, España.

Frontera, E; Guerrero-Carvajal, F; Sánchez-Murillo, J.M.; Reina, D.; Pérez-Martín, J.E.; Alarcón-Elbal, P.M.; Bravo-Barriga, D.

Badajoz Veterinaria, 2022; 26, 28-37

Ilustre Colegio De Veterinarios de Badajoz, Badajoz, España

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones, que, de una forma u otra, han participado en la elaboración de esta tesis.

En primer lugar, quiero dar las gracias:

A la Universidad de Extremadura, por acogerme en su tutela académica para el desarrollo de mi formación investigadora, siendo su Facultad de Veterinaria estandarte en mi profesión veterinaria y presentando siempre un gran interés por el desarrollo científico de los procesos relacionados con la Sanidad animal y de la Salud humana.

A mi directora, la Dra. Eva María Frontera Carrión, y mis codirectores, la Dra. María Martín Cuervo y el Dr. Daniel Bravo Barriga, por sus consejos, trabajo, confianza depositada, esfuerzo y ayuda en el desarrollo de este proyecto y esta tesis para que pudiera finalizar esta etapa de mi vida, sin los cuales no habría sido posible.

Gracias a mi familia: madre, padre, hermano y abuelos, sin su apoyo incondicional, cariño y palabras de ánimo en los momentos más difíciles no hubiera sido posible terminar esta etapa de mi vida.

Gracias también a mis amigos, quienes han servido de ayuda en el desarrollo de esta tesis, ya que muchos de ellos son compañeros de profesión, y por su apoyo en los momentos más duros, a quienes considero más familia que amigos, siendo estos años mi familia cacereña.

Gracias a todo el personal de las unidades de Parasitología y de Medicina y Cirugía de Grandes Animales, por sus enseñanzas a lo largo de estos años y por su trabajo, incluyendo sus alumnos internos, quiénes han sido parte y pieza fundamental en este proyecto.

Por último, gracias a todas las terceras personas, en especial ganaderos, que han participado en este proyecto para mejorar, no solo la sanidad de sus animales, sino también la salud de la población de Extremadura y aportar mayor conocimiento de estas enfermedades.

Gracias nuevamente a todos vosotros, por ayudarme, ahora nos une el vínculo de la amistad, gracias nuevamente a otros muchos colaboradores en el aporte de muestras, que por ser tantos se hace difícil describiros en pocas líneas, pero que sin vuestra ayuda y colaboración no habría sido posible, y agradeceremos también a todos, los buenos momentos que hemos vivido en todos estos años.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	8
LISTA DE ACRÓNIMOS.....	9
1. RESUMEN	10
2. SUMMARY	12
3. INTRODUCCIÓN	15
4. OBJETIVOS	20
5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	22
5.1.AGENTES PATÓGENOS	22
5.2.DIAGNÓSTICO DE FLAVIVIRUS.....	37
5.3.DISTRIBUCIÓN DE FLAVIVIRUS	43
5.3.1. Distribución a nivel mundial.....	44
5.3.2. Distribución a nivel europeo	46
5.3.3. Distribución a nivel español	49
6. RESULTADOS.....	53
6.1.RESULTADOS PUBLICADOS.....	53
6.1.1. Serological evidence of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids from western Spain.....	53
6.1.2. West Nile and Usutu virus infections in wild birds admitted to rehabilitation centres in Extremadura western Spain, 2017-2019.....	69
6.1.3.Circulation of zoonotic flaviviruses in wild passerine birds in western Spain.....	82
6.1.4. Identification of Usutu virus Africa lineage 3 in a survey of mosquitoes and birds from urban areas western Spain	90
6.2.OTROS RESULTADOS	103
6.2.1. Diversidad y distribución de especies de mosquitos en zonas urbanas y periurbanas de las ciudades de Badajoz y Cáceres, España	103
7. DISCUSIÓN.....	119
8. CONCLUSIONES.....	126
9. ANEXOS	129
10. BIBLIOGRAFÍA	133

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura (a) y genoma de ARN de 11Kb de longitud (b) del VNO (de Filette et al., 2012)	23
Figura 2. Numeración sugerida de los linajes del VNO basada en el análisis filogenético (Rizzoli et al., 2015).....	25
Figura 3. Representación gráfica en la línea temporal de la viremia y la respuesta inmune humoral frente al VNO (Rizzoli et al., 2015).....	38
Figura 4. Distribución mundial de flavivirus donde se puede observar la situación del VNO (arriba) y en del VUSU (abajo) (Pierson & Diamond, 2020).....	43
Figura 5. Distribución mundial del VUSU. Los símbolos indican en qué especie se ha detectado el VUSU (hombre, aves, mosquitos o caballos). El método de identificación (molecular o serológico) se indica en colores para cada especie (Clé et al., 2019).....	45
Figura 6. Casos notificados en UE/EEE en la temporada de transmisión 2022. En rojo aparecen los casos notificados en seres humanos y en naranja los casos notificados en animales (European Centre for Disease Prevention and Control, 2022)	47
Figura 7. Municipios con casos acumulados en humanos y focos equinos y focos en aves durante las temporadas 2010-2022 en España (Saravia Campelli et al., 2022).....	50
Tabla 1. Descripción general de los linajes del VNO (Rizzoli et al., 2015).....	26

LISTA DE ACRÓNIMOS

VNO: virus del Nilo Occidental
VUSU: virus Usutu
VBAG: virus Bagaza
ACs: anticuerpos
ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA: European Food Safety Authority
WHO: World Health Organization
MAPAMA: Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente
MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
ARN: ácido ribonucleico
Kb: kilobase
DC-SIGN: receptor de células dendríticas
FNO: Fiebre del Nilo Occidental
WNND: Enfermedad Neuro invasiva grave producida por el VNO
VNT: prueba de neutralización de virus
Aa: aminoácidos
Uex: Universidad de Extremadura
CIBERESP: Centro de Investigación Biomédica en la Red de Epidemiología y Salud Pública
BG: biogents
CDC: Centres for Disease Control
IgM: inmunoglobulina M
IgG: inmunoglobulina G
IgA: inmunoglobulina A
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
rRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real inversa
LCR: líquido cefalorraquídeo
WOAH: World Organization for Animal Health
PNRNT90: prueba de neutralización de virus por reducción en placa
SLE: virus de la encefalitis de St. Louis
VLP: partículas similares a virus
ECE: evaluación de calidad externa
IHA: inhibición de la hemaglutinación
EE. UU.: Estados Unidos
EBD-CSIC: Estación Biológica de Doñana-Consejo Superior de Investigaciones Científicas
IBED: Instituto de Biodiversidad y Dinámica de los Ecosistemas
TCE: Departamento de Ecología Teórica y Computacional
CIBERINFEC: Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas
ML: máxima verosimilitud
ZEPA: Zona de Especial Protección de Aves
INIA/CISA: Instituto de Tecnologías Agrarias/ Centro de Investigación de Sanidad Animal
ORF: fragmentos de lectura abierta

1. RESUMEN

El virus del Nilo Occidental (VNO) es uno de los flavivirus más distribuidos a nivel mundial. Pertenecce a la familia Flaviviridae y su ciclo de transmisión se mantiene entre mosquitos, principalmente del género *Culex* spp., y las aves, pudiendo afectar a otros hospedadores, como los seres humanos y équidos, que actúan como fondos de saco epidemiológico. En el año 2015 se empezaron a notificar oficialmente algunos casos esporádicos por el VNO en équidos en Extremadura, pero no se habían realizado estudios de seroprevalencias ni de vigilancia activa entomológica en esta región. Por ello, los objetivos planteados en este proyecto fueron conocer la seroprevalencia en équidos y aves frente a flavivirus (VNO, VUSU y VBAG), así como conocer la densidad y distribución de los vectores asociados e intentar detectar la presencia de estos virus en los mismos.

Para el estudio de las seroprevalencias en los hospedadores, se tomaron muestras de sangre a 725 équidos, 391 aves procedentes de centros de recuperación y 645 aves del orden Passeriformes. Sobre estas muestras se realizaron pruebas ELISA para detectar la presencia de anticuerpos frente al VNO, siendo confirmadas las muestras positivas y dudosas mediante una prueba de neutralización viral (VNT). Además, se capturaron mosquitos mediante el uso combinado de trampas tipo, CDC, BG-Sentinel y BG-PRO, en zonas periurbanas de la ciudad de Badajoz junto con la toma de muestras de sangre procedente de aves silvestres sanas durante el anillado de las mismas y en zonas urbanas de las ciudades de Cáceres y Badajoz. Los mosquitos capturados fueron identificados y se sometieron a rRT-PCR para la detección viral.

En el caso de los équidos, se obtuvo una seroprevalencia frente al VNO del 19,72% y del 1,5% frente al VUSU. Además, se consiguió aislar el linaje 1 del VNO en los tejidos de un équido que murió con sintomatología aguda en Cáceres. Los factores de riesgo asociados con la infección individual por VNO en équidos fueron la edad (adultos) y el color de la capa (claro), mientras que en las infecciones por VUSU fue la raza (pura), como el pura sangre inglés y el pura raza árabe, frente a los animales cruzados.

En las aves procedentes de centros de recuperación, desde octubre de 2017 a diciembre de 2019, se obtuvo una seroprevalencia frente al VNO del 18,23%, detectándose por primera vez en especies como *Ciconia nigra*, y aislando el linaje 1 en aves sintomáticas *Gyps fulvus* y *Athene noctua*. Frente al VUSU se obtuvo una seroprevalencia del 1,04%, siendo detectado por primera vez en Europa en las especies *Bubo bubo*, *G. fulvus* y *A. noctua*.

Espacialmente, el VNO fue detectado en 53 de 149 municipios de Extremadura, con una amplia distribución por toda la región, aunque las áreas positivas se concentraron en el centro y oeste de Extremadura. Los anticuerpos VUSU se detectaron solo en aves recuperadas de tres municipios. Todos estos resultados demuestran una amplia

circulación de flavivirus en esta región, posiblemente de forma endémica, ya que se detectaron anticuerpos en animales juveniles que aún no habían realizado su primera migración.

En aves silvestres sanas la seroprevalencia alcanzó una media del 3,1% frente al VNO y 0,15% frente al VUSU y, por primera vez en algunas especies del orden Passeriformes, como *Amandava amandava*, *Euplectes afer* y *Cettia cetti*.

En los años 2020 y 2021, se llevó a cabo un muestreo conjunto de mosquitos y aves de zonas periurbanas de la ciudad de Badajoz detectándose por primera vez en España el linaje África 3 del VUSU en mosquitos del género *Culex pipiens*. Además, se obtuvo una prevalencia frente al VUSU del 1,7% en las aves muestreadas, incluyendo nuevas especies a la lista de hospedadores de este flavivirus como *Lanius senator*, *Luscinia megarhynchos* y *A. amandava*. La detección en ambos eslabones estudiados indica una circulación activa y un posible riesgo de exposición para la población humana y animal, con la necesidad de establecer planes de vigilancia específicos.

Por último, en la vigilancia entomológica específica realizada en zonas urbanas de las ciudades de Cáceres y Badajoz, desde mayo de 2021 a abril de 2022, se constató la amplia diversidad de especies de mosquitos en estas zonas, con 18 especies diferentes identificadas. Se detectaron las principales especies de vectores transmisores de estos flavivirus, como *Cx. pipiens* s.l. (siendo la de mayor abundancia, 86%), así como las especies *Culex perexiguus* y *Culex univittatus*, confirmadas mediante análisis molecular. Además, se registraron por primera vez *Aedes vexans*, *Aedes vittatus*, *Aedes albopictus*, *Culex europaeus*, *Culex laticinctus* y *Culiseta subochrea* en Cáceres, y *Aedes pulcritarsis*, *Culex europaeus* y *Culex laticinctus* en Badajoz.

Por tanto, se puede concluir que en Extremadura existe una circulación activa, tanto del VNO como del VUSU. Todos estos datos informan que la situación epidemiológica de flavivirus en esta región es preocupante, al estar afectados todos los eslabones de la cadena epidemiológica, con la implicación que ello supone en la Salud pública. Estos datos deberían instar a las autoridades sanitarias a que se instauraran medidas de control vectorial y vigilancia epidemiológica, así como programas para poder analizar la evolución temporal y observar la variación de prevalencias en los distintos hospedadores de estos flavivirus.

2. SUMMARY

West Nile virus (WNV) is one of the most widely distributed flaviviruses worldwide. It belongs to the family Flaviviridae and its transmission cycle is maintained between mosquitoes, mainly of the genus *Culex* spp. and birds, but it can also affect other hosts, such as humans and equids, which act as epidemiological reservoirs. In 2015, some sporadic cases of WNV in equids started to be officially reported in Extremadura, but no seroprevalence or active entomological surveillance studies had been carried out in this region. Therefore, the objectives of this project were to know the seroprevalence in equids and birds against flaviviruses (WNV, USUV and BAGV), as well as to know the density and distribution of the associated vectors and try to detect the presence of these viruses in them.

For the study of seroprevalences in hosts, blood samples were taken from 725 equidae, 391 birds from recovery centres and 645 birds of the order Passeriformes. ELISA tests were performed on these samples to detect the presence of WNV antibodies, and positive and doubtful samples were confirmed by a viral neutralization test (VNT). In addition, mosquitoes were captured by the combined use of CDC, BG-Sentinel and BG-PRO traps in peri-urban areas of the city of Badajoz together with blood samples from healthy wild birds during banding and in urban areas of the cities of Cáceres and Badajoz. The captured mosquitoes were identified and subjected to rRT-PCR for virus detection.

In the case of equids, a seroprevalence against WNV of 19.72% and 1.5% against USUV was obtained. In addition, WNV lineage 1 was isolated from the tissues of an equine that died with acute symptoms in Cáceres. The risk factors associated with individual WNV infection in equids were age (adult) and coat colour (light), while in USUV infections it was breed (purebred), such as English Thoroughbred and Arabian Thoroughbred, versus crossbred animals.

In birds from recovery centres, from October 2017 to December 2019, a seroprevalence against WNV of 18.23% was obtained, detected for the first time in species such as *Ciconia nigra*, and isolating lineage 1 in symptomatic birds *Gyps fulvus* and *Athene noctua*. A seroprevalence of 1.04% was obtained for WNV, being detected for the first time in Europe in *Bubo bubo*, *G. fulvus* and *A. noctua* species.

Spatially, WNV was detected in 53 out of 149 municipalities in Extremadura, with a wide distribution throughout the region, although positive areas were concentrated in the centre and west of Extremadura. VUSU antibodies were detected only in birds recovered from three municipalities. All these results demonstrate a wide circulation of flavivirus in this region, possibly endemically, as antibodies were detected in juvenile animals that had not yet made their first migration.

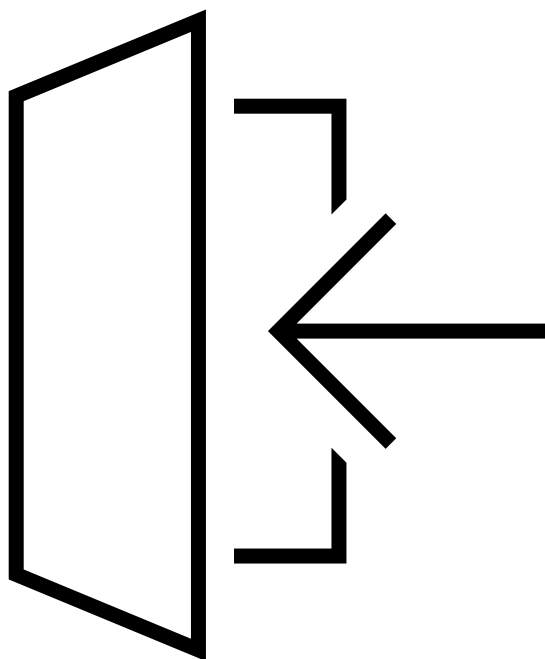
In healthy wild birds, seroprevalence averaged 3.1% for WNV and 0.15% for UUSV, and for the first time in some species of the order Passeriformes, such as *Amandava amandava*, *Euplectes afer* and *Cettia cetti*.

In 2020 and 2021, a joint sampling of mosquitoes and birds in peri-urban areas of the city of Badajoz was carried out, detecting for the first time in Spain the Africa 3 lineage of the UUSV in mosquitoes of the genus *Culex pipiens*. In addition, a USUV prevalence of 1.7% was obtained in the birds sampled, adding new species to the list of hosts of this flavivirus such as *Lanius senator*, *Luscinia megarhynchos* and *A. amandava*. The detection in both studied links indicates an active circulation and a possible risk of exposure for the human and animal population, with the need to establish specific surveillance plans.

Finally, in the specific entomological surveillance conducted in urban areas of the cities of Cáceres and Badajoz, from May 2021 to April 2022, the wide diversity of mosquito species in these areas was noted, with 18 different species identified. The main vector species transmitting these flaviviruses were detected, such as *Cx. pipiens* s.l. (being the most abundant, 86%), as well as the species *Culex perexiguus* and *Culex univittatus*, confirmed by molecular analysis. In addition, *Aedes vexans*, *Aedes vittatus*, *Aedes albopictus*, *Culex europaeus*, *Culex laticinctus* and *Culiseta subochrea* were recorded for the first time in Cáceres, and *Aedes pulcritarsis*, *Culex europaeus* and *Culex laticinctus* in Badajoz.

Therefore, it can be concluded that there is an active circulation of both WNV and USUV in Extremadura. All these data indicate that the epidemiological situation of flavivirus in this region is worrying, as all the links in the epidemiological chain are affected, with the implication that this entails for public health. These data should urge the health authorities to implement vector control and epidemiological surveillance measures, as well as programmes to analyse the temporal evolution and observe the variation of prevalence in the different hosts of these flaviviruses.

INTRODUCCIÓN



3. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades emergentes y reemergentes representan una de las mayores amenazas para la biodiversidad y uno de los problemas de salud pública más importantes, entre las que se incluyen las enfermedades transmitidas por vectores (Semenza & Suk, 2018). Los importantes cambios, tanto ambientales como sociológicos, entre los que destacan el calentamiento global, la globalización y el cambio de suelo, están favoreciendo la expansión de estas enfermedades (Sutherst, 2004). Esto ha planteado nuevos desafíos para las sociedades actuales, incluyendo los impactos negativos de estas nuevas enfermedades transmitidas por vectores sobre los servicios sanitarios (Sherpa et al., 2019). La razón principal para considerar de manera especial a estas enfermedades se basa en el hecho de que los rangos geográficos de muchos de sus agentes etiológicos se están expandiendo, generalmente debido a la propagación de los invertebrados hematófagos utilizados como vectores para su transmisión (Martinet et al., 2019; Sherpa et al., 2019). En conjunto, estos dípteros transmiten una gran cantidad de patógenos que incluyen bacterias, parásitos y diversos virus (Parreira & Sousa, 2015), por lo que su propagación en todo el mundo en los últimos tiempos sigue siendo preocupante, aunque no inesperado. La degradación ambiental, la intensificación del tráfico de mercancías, el aumento de la itinerancia humana y la escasez de medidas de control de vectores están aumentando las probabilidades de contacto humano-vector, así como, favoreciendo la multiplicación, densidad y número de países en los que se detectan dichos vectores, suponiendo amenazas imprevistas para la Salud humana y animal (Gangoso et al., 2020). Entre estos vectores es necesario señalar a los mosquitos culícidos, los cuales son vectores de arbovirus, tales como flavivirus (por ejemplo, el dengue, el Zika y el virus del Nilo occidental) y Alphavirus (por ejemplo, chikungunya), que actualmente plantean inmediatos e implacables amenazas para los seres humanos (Mayer et al., 2017).

Los arbovirus son un grupo heterogéneo de virus, los cuales pertenecen a distintas familias y géneros, con la característica común de ser transmitidos por artrópodos. La mayoría de ellos pertenecen a las familias Togaviridae, Flaviviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae y Bunyaviridae. Hay 534 especies virales registradas en el Catálogo Internacional de arbovirus, de las cuales 150 son patógenos para el hombre y prácticamente todas ellas son virus ARN (Madewell, 2020).

Si nos centramos en aquellos de gran importancia epidemiológica en los últimos años que pertenecen a la familia Flaviviridae, tenemos que nombrar al virus del Nilo occidental (VNO), virus Usutu (VUSU) o virus Bagaza (VBAG), (Papa et al., 2011; García-Bocanegra et al., 2013; Vilibic-Cavlek et al., 2020). En el ciclo de estos virus, los mosquitos actúan como vectores, principalmente las especies pertenecientes al género *Culex*. A través de la picadura se infectan las aves, que son los verdaderos hospedadores amplificadores de estos agentes patógenos (Vilibic-Cavlek et al., 2020; Karim & Bai,

2023). No obstante, tanto los humanos como los équidos pueden ser hospedadores accidentales, actuando como fondos de saco epidemiológico, ya que la viremia es de corta duración y de bajo título (Sánchez-Seco & Navarro, 2005), siendo insuficiente como para transmitir el virus a nuevos vectores que puedan alimentarse nuevamente, a diferencia de lo que ocurre en las aves (García-Bocanegra et al., 2011a).

Las aves silvestres, como principales hospedadores, desempeñan un papel clave en su dispersión, sobre todo en aquellas especies migratorias (Clé et al., 2019). Dada la estratégica situación de España en relación con el paso de aves migratorias entre Europa y África, y la importancia de los humedales como áreas de nidificación de la mayoría de estas aves, nuestro país presenta un riesgo elevado de aparición de infecciones, y, por tanto, de casos clínicos (García-Bocanegra et al., 2011b). A pesar de que la entrada y detección de estos flavivirus en Europa se remonta allá en el año 1996 (Zeller & Schuffenecker, 2004), no fue hasta principios del siglo XXI cuando se intensificó la declaración del número de casos de estas arbovirosis, ocasionado en gran medida por el aumento en el número de especies aviares afectadas, y, por lo tanto, en el número de reservorios para estos flavivirus (Rizzoli et al., 2015).

A pesar de esto, los análisis epidemiológicos realizados en poblaciones de aves silvestres sanas son bajos, lo que significa que muchos casos asintomáticos están pasando desapercibidos, lo que podría llevar a la pérdida de una importante información para una correcta evaluación del riesgo de circulación local.

El VNO es uno de los virus más extendidos por todo el mundo (Chancey et al., 2015). En Europa y la cuenca mediterránea, desde el año 2000 se ha producido un aumento de casos en diferentes hospedadores, siendo el año 2018 uno de los más cruentos hasta la fecha, con más de 1605 personas afectadas y unas 166 muertes (ECDC, 2018). En los años sucesivos, se han seguido registrando casos, tanto en personas como en animales, pero no en un número tan elevado como en ese año. En 2019, fueron notificados 443 casos en personas; en 2020, un total de 333 casos; en 2021, 158 casos; y en 2022, se ha vuelto a registrar un incremento de los casos con 851 reportes en humanos (ECDC & EFSA, 2022). Debido a todos estos casos declarados en los últimos años, estos flavivirus se han convertido en una de las mayores preocupaciones para la salud pública, colocándose en el centro de atención de programas de vigilancia (WHO, 2020; Rodríguez-Alarcón et al., 2021). Por todo ello, es considerado como uno de los agentes zoonóticos más peligrosos en Europa, de acuerdo con el último informe “One Health” de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y el Centro Europeo para el control y prevención de enfermedades (ECDC & EFSA, 2022).

Por su parte, el VUSU ha tenido introducciones en Europa en múltiples ocasiones debido a las aves migratorias, siendo la primera vez en 1996 (Weissenböck et al., 2013). Esto ocasionó brotes en aves con numerosas muertes en los años 1996 y 2001 en Austria

(Bakonyi & Haussig, 2020); y se ha extendido por toda Europa en las últimas décadas, produciendo casos en Alemania, Francia o Reino Unido (Ziegler et al., 2016; Eiden et al., 2018; Folly et al., 2020). Tanto el VNO como el VUSU se han detectado cocirculando en muchas áreas, compartiendo los mismos vectores y hospedadores (Bažanów et al., 2018).

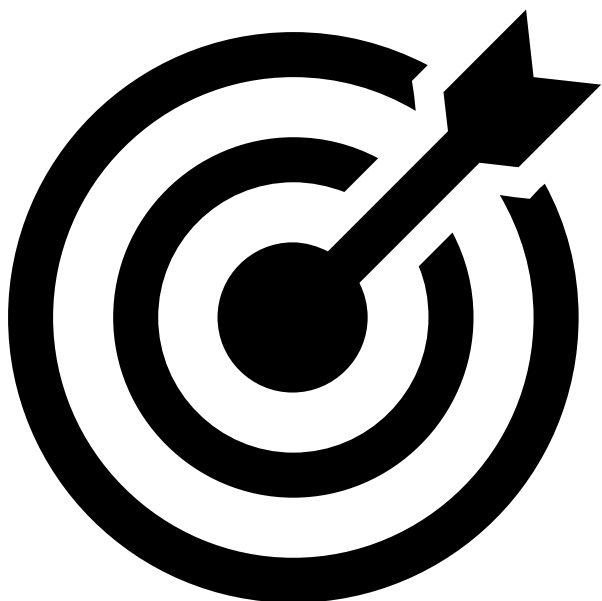
En cuanto al VBAG, también se conoce en Israel como uno de los agentes causales de meningoencefalitis en pavos (Fernández-Pinero et al., 2014). Este virus se aisló por primera vez en la República Centroafricana en 1996 en una muestra de mosquitos *Culex* spp. (Digoutte, 1978) y hasta 2009, este virus estuvo restringido a regiones de África, Israel e India (Bondre, et al., 2009; Fernández-Pinero et al., 2014; Benzarti et al., 2019). Posteriormente, en Europa fue detectado por primera vez en 2010, causando un brote de encefalomiелitis en aves de caza en el sur de España (Agüero et al., 2011; García-Bocanegra et al., 2013; Llorente et al., 2013).

Como ya hemos comentado, estos virus en la actualidad están incrementando su incidencia y distribución por toda Europa, y por ende en España (Bakonyi & Haussig, 2020; Vilibic-Cavlek et al., 2020). Sin embargo, la información epidemiológica en Extremadura es escasa. El primer caso humano del VNO informado en España fue en una persona que estuvo de vacaciones y probablemente se infectó en un pueblo de Badajoz (Sotelo et al., 2012). Además, en el año 2015 también se declararon por primera vez los primeros casos positivos del VNO en caballos de Extremadura (MAPAMA, 2020), lo que sugeriría una posible circulación por la región. Sin embargo, hasta la fecha no había información en cuanto a posibles casos clínicos en aves, ni estudios sobre la seroprevalencia real en la cabaña de équidos fruto de una vigilancia activa, ni se había instaurado una vigilancia entomológica para conocer la circulación real de estos patógenos en mosquitos.

Extremadura es la región de España con mayor volumen de reservas de agua dulce del país, con un importante número de áreas pantanosas, humedales y zonas de anidación para un elevado número y variedad de aves (Hernández Mogollón et al., 2013). Además, debido a su posición geográfica estratégica, esta región es zona de paso de aves migratorias en su viaje entre África y Europa, por lo que juega un papel fundamental en la transmisión de agentes patógenos zoonóticos relacionados con estas (López et al., 2008). Por tanto, esta comunidad reúne una serie de condicionantes, tanto climáticos como epidemiológicos (brotes de enfermedad anteriores), que la hacen ser una zona adecuada para el desarrollo y proliferación de los vectores transmisores de esta enfermedad vírica. Así pues, parece claro que Extremadura podría ser una región en situación de riesgo por estos flavivirus y, por tanto, sería necesario una vigilancia epidemiológica de estas arbovirosis para evitar y prevenir la difusión y propagación de las mismas.

Por todos estos motivos y con el fin de conocer la circulación de algunos flavivirus en Extremadura, se propuso esta investigación, analizando la situación de los mismos entre los hospedadores vertebrados susceptibles, especialmente aves y caballos, así como en los vectores, estableciendo un diagnóstico diferencial entre los diferentes géneros que cursan con un patrón epidemiológico y patológico similar al VNO, como es el virus VUSU en caballos y los VUSU y VBAG, en el caso de las aves.

OBJETIVOS

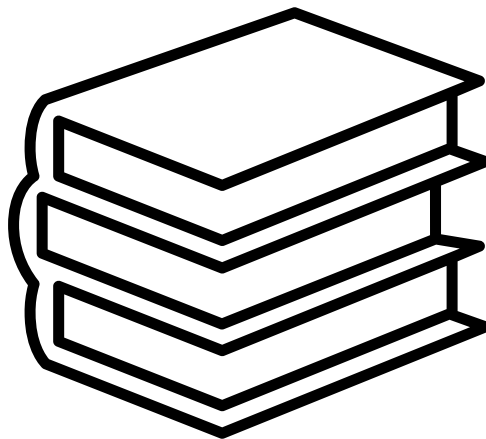


4. OBJETIVOS

Los objetivos que se pretenden alcanzar con el desarrollo de esta tesis doctoral son los siguientes:

1. Conocer la seroprevalencia y distribución de flavivirus en équidos y aves de Extremadura.
2. Caracterizar los linajes circulantes del virus del Nilo occidental y otros flavivirus, en los distintos hospedadores vertebrados e invertebrados.
3. Detectar la distribución de los vectores y presencia de flavivirus en mosquitos de entornos urbanos y periurbanos de Extremadura.
4. Analizar los factores de riesgo asociados a la presencia del virus del Nilo occidental y determinar las zonas de mayor riesgo de transmisión a humanos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5.1. AGENTES PATÓGENOS

Los arbovirus son definidos como todos aquellos virus que se transmiten al ser humano o a otros vertebrados únicamente a través de especies de artrópodos hematófagos, dentro de los cuales conviene destacar especialmente a los mosquitos (Barzon, 2018). Las arbovirosis emergentes y reemergentes son consideradas en la actualidad uno de los mayores riesgos sanitarios y de salud pública, especialmente relevantes los casos causados por flavivirus en Europa (Pierson & Diamond, 2020).

Los flavivirus son un grupo taxonómico importante de virus ARN pertenecientes al género *Flavivirus* y familia *Flaviviridae*. El ARN de los flavivirus codifica tres proteínas estructurales (C-prM-E) en las primeras 50 pares de bases, primer tercio del genoma, y siete proteínas no estructurales en los 150 pares de bases restantes, los otros dos tercios del genoma (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) (Heinz et al., 2000).

La emergencia o reemergencia de estos tipos de virus es ocasionada en la actualidad, por un lado, por el cambio climático y, por otro lado, por los cambios sociales y humanos, tales como la urbanización de entornos rurales o la globalización, la cual ha incrementado tanto el número de viajeros internacionales como el número de intercambios comerciales de mercancías y/o animales (Tolsá-García et al., 2023). Esta situación ha favorecido en los últimos años la propagación de los vectores transmisores de estos flavivirus hacia un número mayor de entornos donde antes no se encontraban, y junto con una mayor distribución de hospedadores infectados, se convierte en la situación ideal para una circulación activa en nuevas áreas (Giesen et al., 2023).

Dentro de la familia *Flaviviridae* es necesario resaltar varios, según su importancia epidemiológica, como el virus del Nilo occidental (VNO) y el virus Usutu (VUSU). También hay que tener en cuenta a otro virus, el virus Bagaza (VBAG), que, aunque se dispone de poca información al respecto, afecta solamente a las aves y al ser humano, y cada vez se detecta más debido a la reactividad cruzada en las pruebas de diagnóstico empleadas en vigilancia de los virus anteriormente comentados (Medlock et al., 2007; Schweitzer et al., 2009; Chancey et al., 2015; Pandit et al., 2018).

Virus del Nilo occidental

El virus del Nilo occidental es un agente zoonótico del género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*, transmitido por mosquitos, generalmente del género *Culex* (Angenvoort et al., 2013). Los mosquitos son los vectores, mientras que las aves son el hospedador principal (Sotelo et al., 2012). Otros vertebrados, especialmente seres humanos y équidos, actúan como fondos de saco ciego epidemiológico, puesto que la viremia que alcanzan estos hospedadores no es suficiente para mantener la transmisión del virus y,

por tanto, se consideran hospedadores accidentales (Papa, Bakonyi, et al., 2011; García-Bocanegra et al., 2013; Vilibic-Cavlek et al., 2020).

El genoma secuenciado de este virus comprende 10.982 nucleótidos con una poliproteína de 3.434 aminoácidos codificada dentro de un único marco de lectura abierto (Richter et al., 2017). La microscopía electrónica y las técnicas de reconstrucción de imágenes establecieron que el VNO es un pequeño virus esférico icosaédrico con un diámetro de 50 nm y una envoltura lipídica que rodea una nucleocápside icosaédrica formada por proteínas de la cápside que están asociadas con el genoma de ARN (

Figura 1a). La secuencia del genoma del VNO y la función de las diferentes proteínas virales en el ciclo de vida viral, así como la evasión inmune se han descrito en detalle (Figura 1b) (Ulbert, 2011).

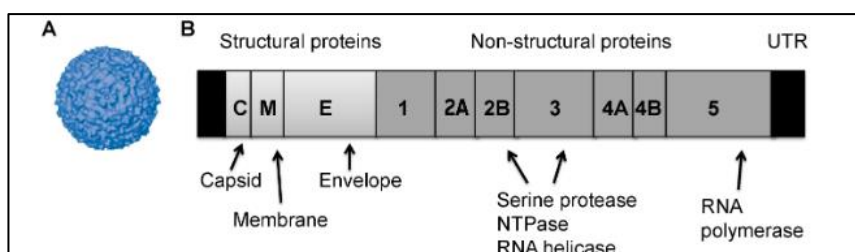


Figura 1. Estructura (a) y genoma de ARN de 11Kb de longitud (b) del VNO (de Filette et al., 2012)

Durante la entrada viral, la proteína E interactúa con uno o más receptores de la superficie celular. No está del todo claro cuáles son los receptores celulares que están implicados en la unión al VNO, pero se ha demostrado que el DC-SIGN, la integrina alfa-Vbeta3 (Bogachek et al., 2010) y la proteína de unión a laminina (Bogachek et al., 2008) son posibles receptores. Tras unirse a la célula, el virus es captado por endocitosis mediada por clatrina (Chu & Ng, 2004) y en la endosoma acidificada la proteína E experimenta cambios de conformación que resultan en la fusión entre las membranas viral y celular (Gollins & Porterfield, 1986). Tras la fusión, el genoma de ARN de cadena positiva se libera en el citoplasma de la célula, traducándose en una única poliproteína (Chambers et al., 1990), que se procesa proteolíticamente para producir tres proteínas estructurales (la proteína de la envoltura E; la proteína precursora de la membrana prM; y la proteína de la cápside C) y siete proteínas no estructurales (NS) (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5). Mientras que los cortes en las uniones C-prM, prM-E, E-NS1, NS4A-NS4B (Nowak et al., 1989), y probablemente también NS1-NS2A (Falgout & Markoff, 1995), son realizados por los péptidos de señal del hospedador ubicados en el lumen del retículo endoplasmático, los enlaces peptídicos restantes son cortados por la proteasa NS3 codificada por el virus (de Filette et al., 2012). La replicación de los flavivirus requiere la proteína viral NS5, que es una ARN polimerasa dependiente de ARN

(Rice et al., 1986; Poch et al., 1989). Esta enzima produce un ARN de cadena negativa "anti sentido" que sirve de molde para la síntesis de muchas copias nuevas del genoma infeccioso de ARN de cadena positiva (de Filette et al., 2012).

El VNO se enlaza a las membranas del retículo endoplasmático que han sido inducidas por él, para salir como viriones inmaduros en los que las proteínas E y prM forman 60 espigas heterotriméricas (de Filette et al., 2012). El tránsito del virión inmaduro a través de los compartimentos del aparato de Golgi, los cuáles al ser ligeramente ácidos, produce la reorganización de las proteínas E en el virión inmaduro, induciendo un cambio conformacional de las proteínas E que quedan planas como dímeros antiparalelos en la superficie del virión (Konishi & Mason, 1993). En condiciones ácidas, la prM permanece asociada al virión y sobresale de la superficie de otra partícula de virus lisa, este cambio conformacional dependiente del pH aumenta la susceptibilidad del prM a una serina proteasa de tipo furina que produce la escisión y liberación completa de la prM durante el proceso de maduración del virión, siendo este un paso necesario en el ciclo de vida del virus (Diamond, 2009). La NS1 intracelular funciona como un cofactor esencial para la replicación viral (Lindenbach & Rice, 1997) y como antagonista de la señalización de los receptores tipo toll (Wilson et al., 2008). Mientras que la NS1 de la superficie celular y la NS1 secretada antagonizan la activación del complemento (Kyung et al., 2006; Avirutnan et al., 2010), la NS2A participa en la biogénesis de las membranas inducidas por el virus, que tienen un papel vital en la formación del virus (Leung et al., 2008). Esta NS2A también inhibe la activación del promotor del interferón- β (Liu et al., 2004). Las pro-proteínas no estructurales NS4B y NS5 de los flavivirus bloquean la activación del mecanismo de señalización JAK-STAT1 (Laurent-Rolle et al., 2010), lo que limita la producción de genes antivirales estimulados por interferón en las células infectadas (de Filette et al., 2012).

De acuerdo con el análisis filogenético del VNO, se conocen un total de 9 linajes de este virus (Figura 2; Tabla 1) (Fall et al., 2017), de los cuales sólo los linajes 1 y 2 han sido relacionados con los casos de infecciones producidas por este virus en humanos (Papa, et al., 2011; Petersen et al., 2013; Christova et al., 2020). Hasta 2004, solo había sido encontrado el linaje 1 en los animales y humanos en Europa (Zeller & Schuffenecker, 2004). Es a partir de entonces, cuando el linaje 2 fue aislado por primera vez en Hungría y Rusia en 2004, distribuyéndose desde el este hasta el centro y suroeste de Europa, causando centenares de casos en aves, humanos y caballos (Savini et al., 2012; Hernández-Triana et al., 2014; Ravagnan et al., 2015; Rizzoli et al., 2015; de Heus et al., 2019). Actualmente, el linaje 2 predomina en numerosas zonas en Europa (Vilibic-Cavlek et al., 2019). Otros linajes han sido identificados, pero no han sido asociados hasta ahora con enfermedades ocasionadas ni en seres humanos ni en animales. Entre ellos se incluyen el linaje 3, también conocido como virus Rabensburg, aislado por primera vez en 1997 en el sur de Moravia (República Checa) en mosquitos *Culex pipiens* y *Aedes rossicus* (Bakonyi et al., 2005), el linaje 4a del VNO, virus de Krasnodar,

detectado primero en una garrapata *Dermacentor*, y posteriormente, en mosquitos y ranas en el sur de Rusia (Lvov et al., 2004), el linaje putativo 4b del VNO, identificado en mosquitos de 2010 en el sur de España (Vázquez et al., 2010) y el linaje 4c detectado en mosquitos *Uranotaenia unguiculata* en Austria en 2013 (Pachler et al., 2014).

En España, los casos de VNO en caballos y seres humanos que se han detectado desde 2010 hasta 2022 (ECDC, 2022; Saravia Campelli et al., 2022), han sido causados fundamentalmente por el linaje 1 (MAPA, 2022), aunque ha sido detectado en un caso de VNO importado el linaje 2, en un viajero que venía de Rumania y que fue hospitalizado por presentar complicaciones neurológicas y gastrointestinales (Velasco et al., 2020). Hasta el momento, el linaje 2 solo se ha detectado en Cataluña tanto en aves del género *Accipiter gentilis* (azores) como en mosquitos (Busquets et al., 2008; Vázquez et al., 2011b; Busquets et al., 2019; MAPA, 2022).

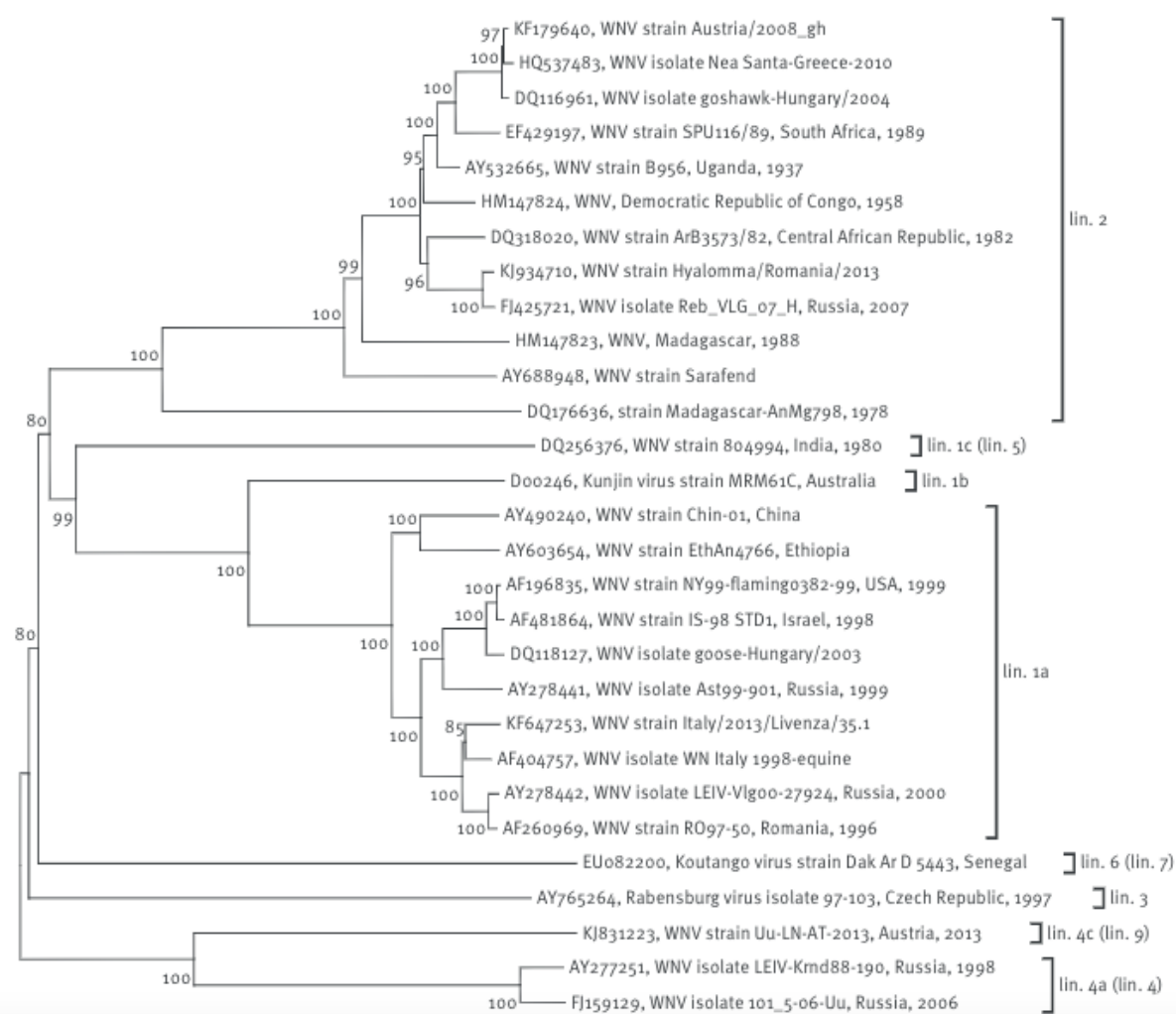


Figura 2. Numeración sugerida de los linajes del VNO basada en el análisis filogenético (Rizzoli et al., 2015)

Tabla 1. Descripción general de los linajes del VNO (Rizzoli et al., 2015)

Suggested lineage numbering	Other lineage labelling in the literature	Representative strain	GenBank accession number	Note	Reference
Lineage 1a	Lineage 1	NY99-flamingo382-99, New York, 1999	AF196835	Most widespread WNV lineage	Lanciotti et al., 1999 [115]
Lineage 1b	Lineage 1	Kunjin MRM61C, Australia, 1960	D00246	Kunjin virus strains, Australia	Coia et al., 1988 [116]
Lineage 1c	Lineage 5	804994, India 1980	DQ256376	Only found in India	Bondre et al., 2007 [117]
Lineage 2	No	B956, Uganda 1937 (oldest WNV strain; WNV prototype strain)	AY532665	Second most widespread WNV lineage	Smithburn et al., 1940 [118]
Lineage 3	No	Rabensburg virus 97-103, Czech Republic 1997	AY765264	Only found in central Europe	Bakonyi et al. [6]
Lineage 4a	Lineage 4	LEIV-Krmd88-190, Russia 1998	AY277251	Originally isolated from Dermacentor ticks	Lvov et al. [7]
Lineage 4b	Lineage 6 / Lineage 7	HU2925/06, Spain	GU047875	Only partial sequence available	Vázquez et al. [8]
Lineage 4c	Lineage 9	WNV-Uu-LN-AT-2013, Austria 2013	KJ831223	Identified in Uranotaenia mosquitoes	Pachler et al. [9]
Lineage 5	Lineage 6	Kunjin virus KUN MP502-66, Malaysia 1966	GU047874, HQ840762	Only partial sequences available	Vázquez et al. [8]
Lineage 6	Lineage 7	Dak Ar D 5443, Senegal	EU082200	Koutango virus	NA
Lineage 7	Lineage 8	ArD94343, Senegal 1992	KJ131502	Only partial sequence available	Fall et al. [10]

Recientemente, han sido descritos para las personas y équidos algunos factores de riesgo que están relacionados con la probabilidad de exposición al VNO, junto con otros flavivirus como el VUSU. En un trabajo realizado entre julio de 2018 y octubre de 2019 por Casades-Martí et al. (2023), los autores contemplaron tres escenarios posibles en su hipótesis inicial, con los que midieron el grado de interacción de los équidos con las aves y vectores. Parece que en las propias explotaciones de équidos es donde observaron un mayor riesgo de exposición al VNO y otros flavivirus, puesto que las interacciones entre aves con équidos y seres humanos son mayores en estas zonas. Por lo tanto, la presencia de aves que habiten en las explotaciones debería ser considerado como un riesgo importante para el mantenimiento y propagación del VNO (Casades-Martí et al., 2023).

En cuanto a las manifestaciones clínicas de esta enfermedad, en el caso de las aves, la mayoría de los animales afectados son asintomáticos, aunque en determinadas especies, en las cuales se ha observado una mayor sensibilidad a este virus, pueden observarse cuadros nerviosos de especial gravedad. Un ejemplo de ello son los buitres, en los que se observan síntomas como ataxia, incapacidad para volar, fiebre, fasciculaciones, estupor y decúbito (Gamino & Höfle, 2013).

Sin embargo, en algunas ocasiones, también se pueden observar problemas que afectan gravemente a la salud de los caballos y de las personas (Beck, et al., 2013). Los principales síntomas que se han descrito en los équidos son ataxia, debilidad en los miembros posteriores, incapacidad para levantarse, fasciculaciones musculares, fiebre y déficit de los pares nerviosos craneales. Además de estos síntomas neurológicos, también pueden desarrollar síntomas inespecíficos como anorexia, depresión, dolor cólico, cojera, fotofobia, ceguera, hiperestesia y rechinar de dientes (Angenvoort et al., 2013). La gravedad de los signos clínicos depende de muchos factores, como la edad, el método de cría, las condiciones de alojamiento, la virulencia de la cepa, la

susceptibilidad genética y la infección previa con este u otros flavivirus (Autorino et al., 2002; Tesh et al., 2002). En el caso de animales de menos de dos años, la probabilidad de morir es menor que en el caso de animales de más de 3 años (Salazar et al., 2004). Además, en el caso de animales que permanecen en decúbito y que tienen incapacidad para levantarse, tienen 78 veces más probabilidades de morir que aquellos animales que no muestran estos síntomas (Salazar et al., 2004). En el caso de los animales no vacunados, las probabilidades de morir se han estimado que son el doble que en el caso de animales vacunados (Salazar et al., 2004). También en algunos estudios se ha determinado que las probabilidades de morir en el caso de las hembras son 2,9 veces mayores que en el caso de los machos (Salazar et al., 2004).

En los seres humanos, la mayoría de las personas infectadas con el VNO son asintomáticas y sólo entre el 20-40% de los casos desarrollan síntomas (Rizzoli et al., 2015). La gran mayoría de las manifestaciones clínicas desencadenan una enfermedad leve similar a un cuadro gripal, definida como fiebre del Nilo Occidental (FNO). Sin embargo, existe otra forma clínica de la enfermedad, la enfermedad neuro invasiva grave (WNND, por sus siglas en inglés), que ocurre solo en menos del 1% de los pacientes infectados. La WNND generalmente abarca tres síndromes diferentes: meningitis, encefalitis y parálisis flácida aguda, que pueden ser mortales, sobre todo en ancianos (Petersen & Marfin, 2002; Sejvar et al., 2003; Papa et al., 2010; Rizzoli et al., 2015). También se han descrito casos ocasionales de hepatitis, pancreatitis y miocarditis (Tsay et al., 1998; Platonov et al., 2001; Weinberger et al., 2001; Papa et al., 2010; Rizzoli et al., 2015).

Virus Usutu

En cuanto a otro de los flavivirus con cada vez más relevancia, cabe señalar al VUSU, también incluido junto con el VNO dentro del serocomplejo de las encefalitis japonesas. Este virus fue detectado por primera vez en mosquitos del género *Culex neavei* en Sudáfrica en 1959 (Woodall, 1964). Es un virus envuelto de aproximadamente 40-60 nm de diámetro, con un ARN monocatenario de polaridad positiva compuesto por 11.064 nucleótidos, que alberga una cubierta de 5' N7-metilguanosina-trifosfato pero que carece de una cola poliA en el extremo 3' (Bakonyi et al., 2004). El genoma del VUSU tiene un único sentido de lectura abierto que codifica una poliproteína de 3.434 aminoácidos que, después de la escisión, genera tres proteínas estructurales (cápside C, premembrana prM y envoltura E) y ocho proteínas no estructurales (NS1/NS1', NS2a, NS2b, NS3, NS4a, 2K, NS4b y NS5 (Beck et al., 2013).

En cuanto a sus hospedadores, el VUSU se mantiene a través de un ciclo enzoótico entre aves, consideradas como hospedadores amplificadores y mosquitos ornitófilos, como vectores (Bazanów et al., 2018). Por lo tanto, los ciclos de transmisión del VUSU y

el VNO son muy similares (Bazanów et al., 2018). Fue detectado por primera vez en mirlos muertos en Austria en 2001 y en Italia en 1996 (Weissenböck et al., 2002). Se ha demostrado que el VUSU puede infectar a más de 50 especies de aves (Nikolay, 2015). El VUSU se ha observado en numerosas aves migratorias europeas, como *Falco tinnunculus* (Cernícalo común), *Sylvia curruca* (Garganta blanca menor) o *Ficedula hypoleucas* (Papamoscas cerrojillo europeo) (Nikolay et al., 2011), pero también en especies residentes, como *Pica pica* (Urraca euroasiática), *Passer domesticus* (Gorrión común) y *Turdus merula* (Mirlo común) (Nikolay, 2015). El VUSU también se ha aislado en búhos en cautividad hallados muertos o moribundos en zoológicos de Austria en 2001 (Bucheibner et al., 2013), en Suiza en el 2006 (Steinmetz et al., 2011) y en Francia entre 2016 y 2018 (Epidemiosurveillance Santé Animale (ESA), 2018).

Entre los síntomas que presentan las aves infectadas, se han observado trastornos del sistema nervioso central. Los signos clínicos más frecuentemente registrados son la postración, desorientación, ataxia y pérdida de peso. La hepatomegalia y la esplenomegalia son las principales lesiones macroscópicas. También se han detectado áreas necróticas e infiltrados inflamatorios compuestos por células linfoides e histiocíticas en el corazón, hígado, riñones, bazo y cerebro de aves infectadas (Bakonyi et al., 2007). Por lo tanto, el VUSU puede ser altamente patógeno tanto para aves silvestres como en cautividad, debido a su amplio tropismo y virulencia en una gran variedad de tejidos y órganos (Chevalier et al., 2009). La circulación del VUSU ha provocado, en consecuencia, una muerte importante de aves en diferentes países europeos (Chevalier et al., 2009), aunque las consecuencias de la mortalidad asociada al VUSU en la dinámica de las poblaciones de aves no se han investigado claramente hasta la fecha. Se debe evaluar la correlación entre el aumento de la mortalidad de las aves y la velocidad de replicación del virus dentro del reservorio natural, así como con el riesgo de infección por VUSU en hospedadores accidentales, como los humanos y los caballos, al igual que para el VNO (Chevalier et al., 2009).

Además de en aves, el VUSU también se ha detectado en mamíferos, aislándose en el cerebro de murciélagos (*Pipistrellus* spp.) hallados muertos en el suroeste de Alemania, lo que cuestiona el papel de estos animales en la amplificación del VUSU (Cadar et al., 2014). En otros mamíferos se han detectado anticuerpos específicos contra el VUSU, aunque las consecuencias de la exposición al VUSU en estas especies solo se han evaluado parcialmente, tales como caballos, perros, murciélagos, jabalíes, rumiantes salvajes y seres humanos (Vanhomwegen et al., 2017; Cheng et al., 2018; Clé et al., 2019; Roesch et al., 2019). En Italia, Serbia, Croacia, Polonia y en la isla de Mallorca en España se realizaron estudios enfocados en équidos (Gaibani & Rossini, 2017; Vanhomwegen et al., 2017; Bazanów et al., 2018). Se han detectado anticuerpos neutralizantes específicos de VUSU en jabalíes en Serbia (Escribano-Romero et al., 2015). En África, las pruebas VNT realizadas en sueros de caballos y perros militares en Marruecos en 2012 también detectaron la exposición de estos animales a VUSU (Durand

et al., 2016). En 2014, otro estudio notificó la presencia de anticuerpos anti-VUSU en 10 equinos en el suroeste de Túnez (Hassine et al., 2010).

Las infecciones ocasionadas por VUSU en seres humanos suelen ser asintomáticas, aunque en algunos casos se han registrado síntomas nerviosos graves, como las meningoencefalitis o encefalitis (Aberle et al., 2018; Carletti et al., 2019; Clé et al., 2019; Nagy et al., 2019), incrementando aún más si cabe el riesgo que suponen estas arbovirosis por su potencial zoonótico y, por ende, su importancia para la salud pública. Hasta 2019, la mayoría de los casos del VUSU diagnosticados durante las pruebas realizadas a los donantes de sangre eran asintomáticos, siendo tan solo notificados 46 casos con sintomatología aguda en Italia, Croacia y Francia (Clé et al., 2019)

Virus Bagaza

El virus Bagaza (VBAG) es otro flavivirus transmitido por mosquitos, que a diferencia del VNO y del VUSU pertenece al serocomplejo Ntaya (Kuno et al., 2007). El VBAG se aisló por primera vez en 1966 en un grupo de mosquitos del género *Culex* en la República Central Africana (Digoutte, 1978). Desde ese momento, se ha detectado en otros países del oeste de África (Traore-Lamizana et al., 1994; Diallo et al., 2005) y la India (Bondre et al., 2009). Sin embargo, en España se detectó por primera vez en 2010 en Cádiz, asociado a un episodio de alta mortalidad ocurrido en perdices rojas y faisanes comunes (Agüero et al., 2011).

En el ciclo de transmisión, los principales hospedadores vertebrados también son las aves, a pesar de que en seres humanos con meningoencefalitis también se han aislado anticuerpos frente al VBAG, pero su patogenicidad en humanos no es aún bien conocida (Kuno et al., 2007; Bondre et al., 2009). En un estudio experimental realizado en aves por Llorente et al. (2015), se comprobó que existía una transmisión directa de este virus entre perdices rojas (*Alectoris rufa*) y faisanes comunes (*Phasianus colchicus*). Además, en este estudio también se determinó que la carga viral de mayor duración se encontró en la base de las plumas de nueva generación, por lo que la toma de muestras de plumas puede ser útil dentro de los programas de vigilancia activa para la detección temprana de este virus (Llorente et al., 2015). En cuanto a su patogenicidad, en el mismo estudio, de las 10 perdices que fueron inoculadas experimentalmente, todas presentaron sintomatología y el 30% fallecieron entre los 6 y los 10 días post infección (Llorente et al., 2015). Sin embargo, en un estudio de campo realizado en España, en Cádiz, en determinadas zonas de caza donde se observó un brote epidémico de mortalidad en perdices y faisanes antes comentado, se estimó que las tasas de morbilidad correspondían al 37% en perdices y al 11% en faisanes; mientras que las tasas de mortalidad fueron del 23% en perdices y del 6% en faisanes (García-Bocanegra et al., 2013). Entre los signos clínicos que se han observado en las aves afectadas por este virus

cabe señalar debilidad, postración, falta de coordinación, ataxia, pérdida de peso y diarrea blanquecina (Agüero et al., 2011; García-Bocanegra et al., 2013). Es necesario destacar que, este episodio coincidió con la notificación de los primeros casos causado por el VNO en caballos en esa zona (ECDC, 2022a).

La longitud del genoma del VBAG es de 10.941 nucleótidos, y los ORF (fragmentos de lectura abierta) codifican 3426 aminoácidos (aa) (Kuno & Chang, 2007). En cuanto al estudio filogenético de este virus existen dos secuencias en la actualidad, una aislada en África y otra en la India. En el caso de la secuencia aislada en España tras su análisis filogenético (Tamura et al., 2011) se determinó que mostró una mayor similitud con la cepa aislada en África (94,1% de identidad) que con la cepa de India (92,8%), aunque ambas cepas estaban más próximas entre sí, que con respecto a la detectada en España. Sin embargo, a pesar de este hecho, no han sido relacionados más episodios de mortalidad en otras especies de aves. Se debería determinar si otras especies de aves son susceptibles a la enfermedad causada por el VBAG a que este virus presenta una gran similitud con el virus de la meningoencefalitis del pavo de Israel (Fernández-Pinero et al., 2014). Además, otros vertebrados podrían estar en riesgo de infectarse con este virus, por lo que es necesario realizar estudios de patogenicidad, ya que la propagación transcontinental de los flavivirus está asociada con la migración de las aves. Es por ello que las migraciones de aves infectadas entre África y Europa podrían haber introducido el VBAG en España (Agüero et al., 2011). No obstante, como de momento no hay evidencias de que este virus sea transmitido por aves migratorias, habría que tener en cuenta otros factores de riesgo de su introducción en España, como la industria avícola y el comercio internacional de aves, especialmente de aves exóticas y de aves de caza (Agüero et al., 2011).

Vectores de flavivirus

A nivel mundial se han detectado flavivirus en 30 especies de mosquitos, de los cuales, solo 23 presentan capacidad vectorial para transmitir el VNO y el VUSU; destacando el género *Culex* (Tolsá-García et al., 2023) .

Los primeros aislamientos de VNO se realizaron a partir de especies del género *Culex* (Taylor et al., 1953), reconocido como el principal género vector de transmisión global de este virus. La especie de mosquito que mayor riesgo de infección-transmisión representa para los virus del serocomplejo de las encefalitis japonesas es *Culex quinquefasciatus* en Norte América. Sin embargo, en concreto para el VNO, la especie que más riesgo representó fue *Culex restuans* en esta región (Tolsá-García et al., 2023). En el caso de Europa, se ha destacado el papel transmisor de *Cx. pipiens* y *Culex modestus* en Francia (Balenghien et al., 2008), así como de *Culex perexiguus* y *Culex univittatus* en la Península Ibérica (Mixão et al., 2016), relacionados con la

transmisión del VNO y el VUSU en aves silvestres y en cautividad (Bucheibner et al., 2013; Vázquez et al., 2011b), aunque la capacidad y/o competencia vectorial puede ser muy variable (Colpitts et al., 2012). En Sudáfrica, se ha demostrado que *Cx. univittatus* transmite de forma efectiva el VNO a las aves (Jupp, 1974). Todos estos mosquitos son principalmente especies ornitófilas del género *Culex*, aunque algunas pueden tener un comportamiento oportunista, como *Cx. pipiens* (Haba & McBride, 2022) siendo también responsables de la transmisión de estos virus a los mamíferos susceptibles, en particular a los humanos y los caballos, que se consideran hospedadores accidentales (Gomes et al., 2013).

El VUSU se ha aislado en muchas especies de mosquitos en todo el continente africano, principalmente en países donde se han implementado programas de vigilancia entomológica, como Senegal, Kenia y Uganda (Nikolay et al., 2011; Ochieng et al., 2013). Del mismo modo, también se ha detectado más recientemente en el sur y centro de Europa, como en Italia o Austria (Camp et al., 2019). Las especies de mosquitos en las que se ha detectado el VUSU con mayor frecuencia pertenecen al género *Culex* como *Cx. modestus*, *Culex neavei*, *Cx. perexiguus*, *Culex perfuscus*, *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. univittatus*, pero también en otros géneros como *Aedes albopictus*, *Aedes caspius*, *Aedes detritus*, *Aedes japonicus*, *Aedes minutus*, *Anopheles maculipennis*, *Coquilletidia aurites*, *Culiseta annulata* y *Mansonia africana*.

La competencia vectorial de *Cx. pipiens*, *Cx. neavei* y *Cx. quinquefasciatus* para el VUSU se ha demostrado en condiciones de laboratorio (Nikolay et al., 2012; Cook et al., 2018). En Europa *Cx. pipiens* se considera como el principal vector transmisor, tanto del VNO como del VUSU a los seres humanos (Becker et al., 2012). Es una especie principalmente ornitófila, pero que también puede alimentarse de mamíferos (Haba & McBride, 2022), lo que podría ser un vector puente para la transmisión entre diferentes hospedadores. Se ha corroborado que la competencia vectorial de *Cx. pipiens* es mayor para el VUSU que para el VNO, al menos en condiciones de temperatura elevada (a 28°C) (Fros et al., 2015). Sin embargo, en un estudio reciente, especies del género *Cx. pipiens* infectados con una cepa africana del VUSU mostró una competencia vectorial muy baja (Hernández-Triana et al., 2018). Estos resultados obtenidos en los estudios de campo, aunque son contradictorios con infecciones experimentales previas, podrían explicarse por la variabilidad genética de las cepas del VUSU y las diferencias en la susceptibilidad entre diferentes poblaciones de la misma especie de mosquito o los ecotipos de *Cx. pipiens* (*molestus* y *pipiens*, así como híbridos) para el mismo virus (Haba & McBride, 2022). Por otro lado, las presiones selectivas en las infecciones experimentales en laboratorio de las poblaciones de mosquitos pueden modificar su susceptibilidad a la infección; además, los parámetros experimentales, como los títulos de virus en la sangre durante la infección oral y la temperatura, así como, la duración de la incubación, también pueden influir en la competencia de los mosquitos (Kramer, 2016). Por el contrario, las poblaciones norteamericanas y europeas de *Ae. albopictus* parecen ser

resistentes a la infección por el VUSU, incluso cuando esta especie se ha encontrado repetidamente infectada en la región de Emilia-Romana, en el norte de Italia (Calzolari et al., 2017; Puggioli et al., 2017; Cook et al., 2018). También se ha demostrado que las poblaciones de *Ae. albopictus*, aunque su comportamiento es preferentemente mamofílico, pueden alimentarse de aves, aunque es poco frecuente y no se alimenta de más de un ave (Richards et al., 2006), por lo que, se deben realizar investigaciones adicionales en el laboratorio (competencia vectorial) y en el campo (capacidad vectorial) para aclarar su papel en la transmisión del VUSU (y también del VNO) y el riesgo asociado para los seres humanos. En el caso del VBAAG también es un flavivirus que puede ser transmitido por estos géneros de mosquitos. De manera específica ha sido aislado en Mauritania y Senegal, en individuos de las siguientes especies *Aedes fowleri* (dos cepas), *Cx. neavei* (18 cepas) y *Culex poicilipes* (cinco cepas). Sin embargo, en Europa no ha sido aislado en mosquitos, a pesar de que ha sido detectado en aves (Diallo et al., 2005; Höfle et al., 2022).

Por lo tanto, en la vigilancia entomológica debemos tener en cuenta parámetros fundamentales como son la competencia y la capacidad vectorial de una especie particular de mosquito, la cual dependerá de múltiples factores. Tales factores son la densidad del vector en relación con la densidad del hospedador; la tasa diaria de alimentación de sangre del vector en una determinada especie de hospedador; la proporción de vectores que desarrollan estadios de patógenos infecciosos; la tasa de supervivencia diaria del vector; la duración en días que el patógeno se almacena en la saliva (período de incubación), etc.... (Engler et al., 2013). Estos factores son los que se modifican en los estudios de laboratorio (Anderson & Rico-Hesse, 2006). Sin embargo, uno de los objetivos de la vigilancia entomológica es generar datos que se puedan aplicar en todos los estudios de campo para calcular la capacidad vectorial o para encontrar parámetros que puedan sustituirlo para medir esto. Para ello, los parámetros clave que influyen en la capacidad vectorial son la densidad de determinadas especies, sus preferencias por los hospedadores y la tasa de contacto entre el vector y el hospedador, así como la variedad de factores climáticos (Engler et al., 2013). Por lo tanto, la propagación de los virus transmitidos por artrópodos como los flavivirus depende de muchos factores (Engler et al., 2013).

Es necesario destacar que el vector infecta a los hospedadores vertebrados únicamente cuando el virus se encuentra en la saliva del mosquito mientras éste pica al hospedador para realizar las ingestas de sangre (Kramer & Ciota, 2015). Por ello, en los estudios de campo, es importante analizar de forma separada las diferentes partes del cuerpo de los mosquitos (Bravo-Barriga et al., 2016), ya que, si el genoma viral se encuentra solo en el abdomen, no se podría confirmar que esa especie pueda ser competente en la transmisión viral (Kramer & Ciota, 2015). En la actualidad, hay pocos estudios de campo en los que se realice la disección del cuerpo de los mosquitos en diferentes partes, ya que normalmente los mosquitos se analizan en grupos de entre 1

y 50 individuos con el cuerpo completo (Tabachnick, 2013). Por otro lado, en estos estudios de laboratorio no se tienen en cuenta los factores medioambientales que influyen en estos vectores; tales como, las fluctuaciones en las temperaturas ambientales, la edad del mosquito, la dosis viral, las cadenas del virus o el microbiota del estómago de estos insectos (Pulgarín et al., 2018). Se cree que los factores macroecológicos pueden ayudar a identificar estos amplios patrones temporales y espaciales que existen entre los hospedadores y los virus (Stephens et al., 2016; Pandit et al., 2018), lo cual nos permitiría distinguir entre infecciones naturales e indicadores de transmisión de estos flavivirus entre diferentes especies de mosquitos (Tolsá et al., 2018). Las estrategias basadas en la macroecología pueden usarse para identificar zonas de especial riesgo para la entrada y circulación de estos virus (Albery et al., 2021). Además, la determinación de zonas de riesgo es una pieza clave para definir los objetivos de los programas de vigilancia en función del conocimiento de la distribución de especies de mosquitos de la región objeto de estudio (Calzolari et al., 2020). Por lo tanto, resulta fundamental conocer la distribución y nichos ecológicos de los mosquitos para determinar de forma más apropiada la interfaz virus-vector para poder entender la situación global actual (Mayer et al., 2017). Debido a la actual propagación de todos estos vectores a nivel mundial, resulta necesario fortalecer la capacidad entomológica en Europa para mejorar la vigilancia y la evaluación de los riesgos asociados a estos vectores, e identificar las estrategias de control más apropiadas y respetuosas con el medio ambiente, especialmente en los puntos críticos de aparición y propagación de flavivirus. También es importante señalar que el número de productos disponibles para el control de mosquitos se ha reducido en los últimos años (European Commission, 2022), por lo que, se necesitan urgentemente nuevos insecticidas y repelentes, ya que los disponibles están perdiendo eficacia por aparición de resistencias (Rizzoli et al., 2015; Pichler et al., 2022). Además, existe una clara necesidad de definir y evaluar la efectividad de las estrategias integradas de control de mosquitos, así como, concienciar a la población para reducir las fuentes de estos insectos (Rizzoli et al., 2015).

La vigilancia entomológica activa y específica del VNO, así como de otros flavivirus en las poblaciones de mosquitos, ofrece la oportunidad de detectar los virus antes de la aparición de casos en équidos y humanos e instaurar un seguimiento a lo largo del tiempo (Calzolari et al., 2012). Esto proporciona una ventaja a la hora de establecer métodos de control, como el uso de productos adecuados para la lucha vectorial, introducir medidas de bioseguridad para el ganado o iniciar la vacunación preventiva (Calzolari et al., 2020). Sin embargo, la vigilancia activa que predice los brotes de virus se ve desafiada por una variedad de factores, incluido el escaso conocimiento de los factores sociales y ecológicos que determinan la tasa de contacto entre el vector y el hospedador y que facilitan la transmisión a los seres humanos y los caballos (Medlock et al., 2007). Las limitaciones prácticas, como el apoyo financiero institucional o privado, las dificultades en la identificación de mosquitos debido a la falta de entomólogos especialistas (Almeida et al., 2017) y una detección sensible, rápida y eficaz de los virus

en los mosquitos también pueden impedir una vigilancia eficaz. Un área clave de esto es la identificación precisa de las especies de mosquitos, ya que solo ciertas especies en un área determinada pueden actuar de manera efectiva como vectores para las poblaciones humanas o equinas (Medlock et al., 2007).

Por lo tanto, esta vigilancia entomológica clásica se debe realizar en una variedad de sitios de recolección ubicados en áreas de riesgo o en áreas con circulación de virus, y tiene como objetivo capturar e identificar posibles especies de vectores transmisores del VNO y otros flavivirus (VUSU y VBAG), así como determinar su abundancia y distribución. Se utilizan diferentes trampas y métodos para recolectar mosquitos, como las trampas de luz CDC, las cuales se colocan aproximadamente a 1,5 m del suelo y se mantienen en funcionamiento durante una o dos noches consecutivas; las trampas BG-Sentinel y trampas grávidas, que se colocan en el suelo en lugares protegidos de los ataques de animales y se mantienen en funcionamiento durante unas 24-48 horas (Degener et al., 2019). El uso conjunto de diversas trampas permite una captura más diversa, puesto que algunas trampas son más eficaces para los mosquitos del género *Culex* spp. y otras más selectivas para las especies diurnas del género *Aedes* (Degener et al., 2019). Las trampas de aspiración se utilizan para recolectar mosquitos una vez que se han alimentado en sus sitios de descanso (paredes de refugios para animales), y la recolección de larvas también se utiliza para mejorar la monitorización de las especies de mosquitos y observar la abundancia de determinadas especies (Degener et al., 2019). La temporada de detección de estos flavivirus se realiza mensualmente en áreas con circulación activa del virus y de marzo a octubre en zonas de vigilancia (áreas consideradas en riesgo de introducción del virus). Los mosquitos se identifican y se suelen agrupar (un máximo de 50 individuos/grupo) por sitio de captura, fecha de recolección, método de captura, especie, sexo y estado de la hembra (con sangre o sin alimentar), analizándose dichas muestras para el VNO y otros flavivirus mediante RT-PCR (del Amo et al., 2013).

Por último, en cuanto a métodos de vigilancia pasiva, también podemos nombrar el uso de las tarjetas FTA® Cards cebadas (por ejemplo, con miel), que se usa en combinación con el resto de las trampas que han sido comentadas anteriormente, siendo demostrada su eficacia, sobre todo en zonas de baja prevalencia (Wipf et al., 2019).

En cuanto a la vigilancia entomológica realizada en distintos países de Europa para la detección de estos flavivirus se obtuvieron datos dispares (Engler et al., 2013):

En Italia, se identificaron y analizaron 5184 pools de mosquitos para el VNO y 3646 para el VUSU, de los cuales, se detectó VNO en 10 pools de mosquitos que incluían hembras de *Cx. pipiens*, *Ae. caspius* y *Cx. modestus* (Engler et al., 2013). En Grecia, las especies dominantes durante el verano son: *Ae. caspius*, *Cx. pipiens* y *Cx. modestus* y tres especies de *Anopheles* spp. Las dos primeras especies están presentes en todo el

país, mientras que *Cx. modestus* y *Anopheles* spp. se encuentran en los humedales, y especialmente en los campos de arroz (Engler et al., 2013). En el caso de Suiza, nunca se ha detectado VNO en mosquitos, pero debido a la presencia de casos positivos en el norte de Italia, se ha establecido un sistema de vigilancia del VNO y otros virus transmitidos por mosquitos, sobre todo en el sur del país, pero con intención de implementarlo en todo el territorio. En 2011/2012, fueron capturados un total de 16.982 mosquitos del género *Culex* (principalmente *Cx. pipiens*), 4.597 *Aedes vexans* y 3.938 *Ae. albopictus*. En ninguno de los grupos de mosquitos se aisló el VNO, pero sí secuencias del VUSU, aunque no fueron secuencias relacionadas con casos humanos (Engler et al., 2013). En el caso de Reino Unido, un solo artículo ha informado de la detección del VNO en aves silvestres seropositivas (Folly et al., 2020). Los resultados nunca se repitieron en la vida silvestre y no ha habido casos humanos o equinos. En cuanto a las especies de mosquitos capturadas como posibles candidatos para la transmisión del VNO en este país han sido los siguientes; *Aedes cinereus*, *Aedes cantans*, *Ae. detritus*, *Aedes punctor*, *Anopheles plumbeus*, *Coquillettidia richiardii*, *Cx. pipiens*, *Culex pipiens molestus*, *Culex torrentium*, *Cs. annulata*, *Culiseta litorea*, *Culiseta morsitans*, *Cx. modestus* y *Ae. vexans*. Sin embargo, en ninguno de estos individuos se han aislado secuencias de estos flavivirus (VNO ni VUSU) (Engler et al., 2013; Medlock et al., 2007). En Alemania, se han llevado a cabo amplios estudios de vigilancia sobre miles de aves silvestres y domésticas y de equinos (Seidowski et al., 2010; Ziegler et al., 2012), así como sobre mosquitos. Entre las varias decenas de miles de mosquitos que se han procesado, varias especies de mosquitos, que se han reportado, son nuevas en Alemania, tales como *Ae. albopictus*, *Ae. japonicus*, *Anopheles daciae* y *Culiseta longiareolata* (Kronefeld et al., 2012; Werner et al., 2012). En 2010, el VUSU fue aislado en mosquitos *Cx. pipiens* atrapados en la ciudad de Weinheim (Jöst et al., 2011). Durante el verano de 2011, se observó una mortalidad considerable de aves silvestres y en cautividad en el suroeste de Alemania, analizando 168 aves muertas y detectando ARN de VUSU en 80 individuos de seis especies. Por lo tanto, se demostró que la mortalidad de las aves estaba asociada con la aparición del VUSU (Becker et al., 2012).

En el caso de España, existen numerosos estudios sobre la presencia y distribución de posibles vectores competentes del VNO y otros flavivirus, así como la detección de éstos en los mosquitos. En un estudio realizado entre los años 2001-2005 en las provincias de Huelva, Tarragona, Barcelona y Girona por Aranda et al., (2008) se analizaron 72.895 mosquitos hembra, los cuales pertenecieron a 20 especies de los géneros *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*, *Coquillettidia* y *Uranotaenia*. Según la lista de especies de mosquitos españoles (Bueno-Marí et al., 2012), las 20 especies capturadas representaban el 37% de todas las especies presentes en el país (Encinas Grandes, 1982; Padrós, 1997; Eritija et al., 2000). La especie más abundante fue *Ae. caspius* (40,9%), seguida de *Cx. pipiens* (32,3%), *Culex theileri* (10,9 %), *Anopheles atroparvus* (6,6 %) y *Cx. modestus* (4,6%). Más de la mitad (56,3%) del total de mosquitos capturados se capturaron en Huelva, seguida de Girona (22%), Tarragona (12%) y

Barcelona (9,6%). En este mismo estudio se amplificaron secuencias de flavivirus en 111 de los 4723 grupos de mosquitos analizados. Las secuencias de flavivirus identificadas fueron virus específicos de insectos, como el virus Kamiti River. Huelva fue la provincia donde se obtuvieron mayor número de grupos de mosquitos positivos (64), seguida de Girona (36), Tarragona (8) y Barcelona (3). La especie con mayor número de grupos de mosquitos positivos fue *Cx. theileri* con un total de 50, seguido de *Ae. capius* con 29, *Ae. vexans* con 16, y *Cx. pipiens* con 9 (Aranda, et al., 2008).

Años más tarde, el VUSU fue detectado en un grupo con 3 mosquitos hembra de la especie *Cx. pipiens* capturados en agosto de 2006 en el delta de Llobregat (Busquets et al., 2008). Además, en 2011 (Vázquez et al. 2011b), confirmaron, por primera vez en España, la circulación y primera detección del linaje 1 del VNO y del VUSU en mosquitos *Cx. perexiguus*, lo que evidencia a este mosquito como un vector importante de estos flavivirus en nuestro país, como también ya fue descrito en Israel (Orshan et al., 2008). Las secuencias del VNO y el VUSU detectadas en este estudio fueron muy similares a las de VNO detectadas en águilas reales en 2007 (Jiménez-Clavero et al., 2008) y las de VUSU españolas detectadas en *Cx. pipiens* en Cataluña en 2006 (Busquets, et al., 2008). Hasta ahora, no se han detectado infecciones en humanos por el VUSU, pero sí en animales en España, al igual que se han descrito casos de enfermedad por VNO en humanos, aves y caballos (ECDC, 2022b, 2022a). Aunque ambos virus podrían haber sido reintroducidos por aves migratorias repetidamente en la región mediterránea, el hecho de que las secuencias encontradas sean muy homogéneas y su detección frecuente en los últimos años, podría sugerir una circulación endémica de estos virus.

5.2. DIAGNÓSTICO DE FLAVIVIRUS

Además del estudio clínico y patológico de los pacientes (humanos y/o animales), las pruebas laboratoriales para el diagnóstico del VNO y otros flavivirus comprenden la serología, el aislamiento de virus y la RT-PCR (WOAH, 2022a).

La respuesta para combatir la infección causada por el VNO es esencialmente una respuesta inmunitaria específica o humoral, mediada por anticuerpos (ACs), ya que la respuesta inmune no humoral o inespecífica, no limita la diseminación vírica, en particular al Sistema Nervioso Central (SNC) (Campbell et al., 2002), siendo los anticuerpos asociados a la inmunoglobulina M (IgM) los que limitan la diseminación vírica en el hospedador. En humanos, los anticuerpos contra el VNO comienzan a aparecer entre el cuarto y el séptimo día después de la infección y los anticuerpos IgM ya son detectables en los primeros momentos después de la aparición de los síntomas, alcanzando su máximo a las 2 semanas de la infección, para luego disminuir rápidamente a lo largo de varias semanas o meses (Barzon et al., 2013). En el 80% de los pacientes humanos, los anticuerpos detectables en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) están presentes a los 8 días (Gould & Fikrig, 2004) y en la mayoría de los sueros humanos, las IgM persisten durante un periodo más largo de lo esperado inicialmente, entre 50-250 días (Habarugira et al., 2020; WOA, 2022b). Los anticuerpos IgM no atraviesan la barrera hematoencefálica, por lo que su presencia en el LCR refleja una producción intratecal o un daño en la propia barrera hematoencefálica (Tardei et al., 2000). Los ACs relacionados con la inmunoglobulina G (IgG) aparecen pocos días después de la aparición de la IgM (Petersen et al., 2002; Roehrig et al., 2002; Shrestha & Diamond, 2004), generalmente 12 días después del inicio de los síntomas y pueden persistir durante años. Estos ACs eliminan eficazmente el virus y median la inmunidad protectora a largo plazo. La respuesta de las células T, mediada principalmente por linfocitos CD8+, también desempeña un papel crucial en la recuperación, especialmente en la eliminación del virus (Shrestha & Diamond, 2004). Además, se ha descrito que los interferones desempeñan un papel importante en la respuesta contra los flavivirus, ya que inhiben la infección in vitro (Anderson & Rahal, 2002) y los ratones deficientes en interferones muestran una mayor tasa de mortalidad tras una infección por el VNO (Lobigs et al., 2003). Por lo tanto, el diagnóstico de infección por VNO generalmente se basa en la demostración de anticuerpos específicos contra VNO en suero o LCR. La Figura 3 dibuja una línea de tiempo de marcadores clínicos y de diagnóstico durante la infección humana por VNO. También se ha demostrado que el ARN del VNO se puede detectar en la orina durante mucho más tiempo y en concentraciones más altas que en la sangre o el LCR en personas con VNO en su forma febril o la forma neuro invasiva del VNO (Murray et al., 2010; Barzon et al., 2013). La duración de la detección del ARN del VNO en la orina parece depender del curso de la enfermedad y podría durar 20 días o más (Barzon et al., 2013). La implementación de las pruebas de ARN del VNO y el

aislamiento de las muestras de orina en los protocolos de rutina para el diagnóstico del VNO demostraron la utilidad de estas pruebas para la confirmación de los casos (Murray et al., 2010; Barzon et al., 2013, 2014; Kurolt et al., 2014).

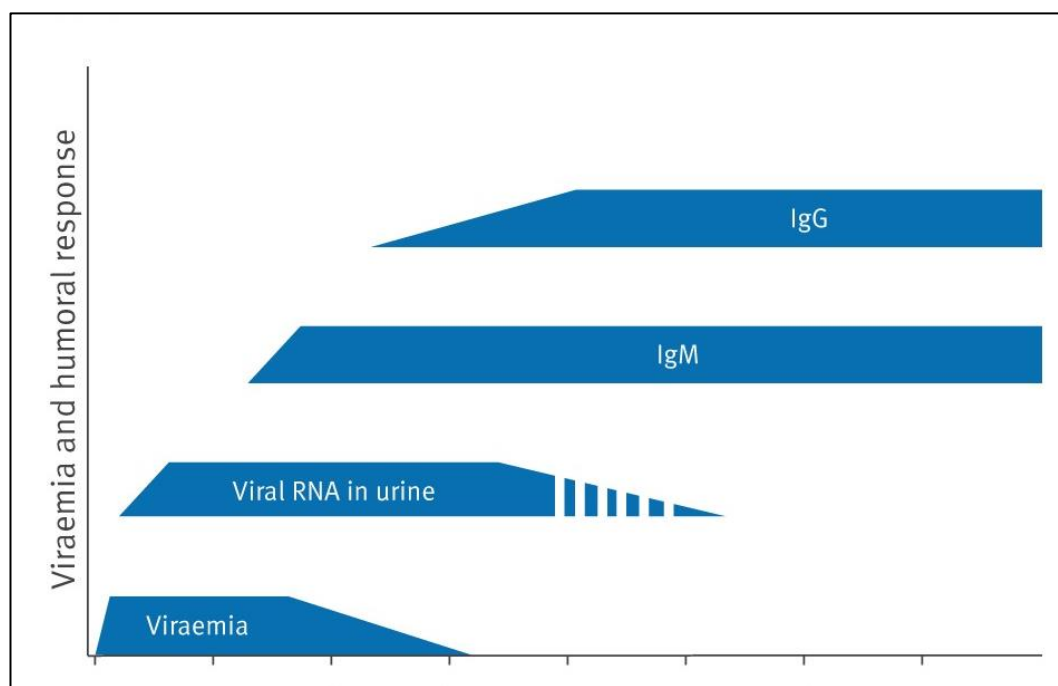


Figura 3. Representación gráfica en la línea temporal de la viremia y la respuesta inmune humoral frente al VNO (Rizzoli et al., 2015)

Como ya se ha comentado, las pruebas serológicas siguen siendo el principal método de diagnóstico de la infección por el VNO, basadas en la detección de ACs (Davis et al., 2001; Martin et al., 2002), pero la reactividad cruzada contra otros flavivirus limitan la especificidad de las pruebas (Calisher et al., 1989). Este hándicap hace que la prueba serológica de referencia recomendada por la Organización Mundial para la Sanidad Animal (WOAH, por sus siglas en inglés) para la detección del VNO siga siendo la prueba de neutralización del virus (VNT) (WOAH, 2022a). La VNT puede realizarse en diferentes tipos de placas, siendo la prueba de Neutralización por Reducción de Placas al 90% (PRNT90) una de las más utilizadas, según protocolos estandarizados (Lindsey et al., 1976; Beaty et al., 1995). También se pueden usar placas de microtitulación de 96 pocillos, la llamada micro-VNT (Llorente et al., 2019), la cual ha demostrado ofrecer resultados similares a los de la prueba PRNT90 (di Gennaro et al., 2014; WOAH, 2022b). La micro-VNT también requiere un menor volumen de muestra que la PRNT90, lo cual es muy relevante cuando se analizan sueros de aves, donde normalmente se dispone de bajos volúmenes de muestra. Además, el trabajo de Llorente et al., (2019) reforzó el hecho de que la VNT realizada en paralelo con flavivirus co-circulantes es más específica

que las pruebas ELISA para la detección de anticuerpos contra el VNO, apoyando la utilidad de esta técnica como método de confirmación. Además, este estudio corroboró que existen reacciones cruzadas en los métodos de diagnóstico serológico (incluida la prueba VNT) no solo entre flavivirus del mismo serocomplejo (VNO y VUSU), sino también de serocomplejos diferentes (VNO/VUSU y VBAG), como se observó anteriormente con otros flavivirus como el virus de la encefalitis japonesa y el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (Stiasny et al., 2013; Klaus et al., 2014). Estas observaciones también pueden ser relevantes cuando se trata de diagnóstico humano en áreas con co-circulación del VNO y otros flavivirus como la fiebre amarilla, la encefalitis japonesa, el Zika, el dengue o el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas en viajeros que han visitado países endémicos y en personas vacunadas contra algunos de estos virus (Llorente et al., 2019).

En los últimos años se han desarrollado métodos de enzimoimmunoanálisis de absorción (ELISA). Estas pruebas ELISA pueden clasificarse en tres tipos: IgG, MAC-ELISA y ELISA de bloqueo de epítomos. Los inmunoensayos recomendados son el ELISA de captura de anticuerpos IgM (MAC-ELISA) y el ELISA indirecto de IgG. Estas pruebas tienen la ventaja de ser rápidas, reproducibles y menos costosas que los métodos clásicos (aquellos basados en la detección del ARN viral). Además, algunas de ellas utilizan reactivos no infecciosos, lo que permite a los laboratorios que no tienen la capacidad de manipular el VNO realizar tanto pruebas primarias como cribados a gran escala. Gracias al MAC-ELISA se pueden detectar infecciones agudas (muestras de suero tomadas entre los 8 y 45 días después de la infección), ya que detecta los primeros anticuerpos tanto en el suero como en el LCR. La sensibilidad estimada del MAC-ELISA es del 91,7% y la especificidad del 99,2% para sueros equinos (Long et al., 2006). Tanto la detección de anticuerpos IgM en suero como en LCR son indicativos de infección (Tardei et al., 2000; Marfin & Gubler, 2001; Martin et al., 2002). El inicio de la síntesis de los ACs asociada a IgM puede incluso aparecer primero en el LCR (Tardei et al., 2000). Los resultados de MAC-ELISA se correlacionan cualitativamente bien con los resultados de la VNT; y la reactividad cruzada de IgM anti-VNO con otros virus del serocomplejo de las encefalitis japonesas es menos significativa que para los ACs asociados a IgG (Tardei et al., 2000; Martin et al., 2002). Sin embargo, el MAC-ELISA tiene dos grandes limitaciones; en primer lugar, si la muestra de suero se toma poco después de la infección, es posible que no se detecten los ACs asociados a IgM, lo que daría lugar a resultados falsos negativos, por lo que las muestras de suero en fase muy aguda deben analizarse para detectar ARN o virus (siempre que se haya mantenido la cadena de frío). En segundo lugar, dado que en algunos casos (sobre todo humanos), los anticuerpos IgM pueden persistir durante más de un año (Roehrig et al., 2003), la capacidad de MAC-ELISA para discriminar entre las infecciones actuales y las de temporadas anteriores es reducida. Para solventar eso, se desarrolló un ELISA de captura de IgA y se probó con un panel de sueros humanos (Prince & Lapé-Nixon, 2005), pero finalmente se descubrió que las IgA

del VNO persisten durante semanas o incluso meses en humanos, como las IgM (Prince et al., 2005). Por otro lado, el protocolo de la prueba ELISA-IgG indirecta para arbovirus también ha sido estandarizado para sueros humanos por el CDC para su aplicación en un gran número de laboratorios de EE. UU. (Johnson et al., 2000). Posteriormente, se ha adaptado para caballos (Davis et al., 2001) y para varias especies de aves (Ebel et al., 2002). Además, se han propuesto protocolos ELISA e inmunofluorescencia (IFA) para determinar la avidez de IgG (Euroimmun AG, Luebek, Alemania y Panbio, Queensland, Australia) de un único suero para diferenciar entre infecciones recientes o pasadas (de Filette et al., 2012). Los nuevos avances en la detección serológica frente al VNO, señalan que, aunque las pruebas ELISA son más rápidas que la VNT, a veces requieren al menos 2 días, ya que es necesario realizar la incubación durante la noche. De este modo, hay que mencionar dos métodos alternativos para una detección aún más rápida de ACs específicos anti-VNO. Uno es un inmunoensayo de fibra óptica de IgG anti-VNO, que utiliza biosensores y quimioluminiscencia (Herrmann et al., 2005). Esta técnica es especialmente rápida y también ha demostrado ser más sensible que el ELISA colorimétrico o quimioluminiscente clásico. El otro método se basa en la proteína E recombinante acoplada covalentemente a microesferas de poliestireno fluorescentes (Wong et al., 2003, 2004). La reacción se evalúa mediante la intensidad de fluorescencia de la microesfera medida por un citómetro de flujo simplificado. Una prueba primaria detecta los ACs asociados tanto a IgG como a IgM y una prueba complementaria con depleción de IgG puede detectar específicamente los ACs asociados a IgM. Este inmunoensayo basado en microesferas permite la detección de ACs humanos IgM e IgG tanto en suero como en LCR en 2,5 h, pero apenas diferencia los ACs anti-VNO de otros ACs anti-flavivirus. El mismo inmunoensayo basado en microesferas, acoplado con la proteína NS5, discrimina de forma más fiable entre las infecciones por el VNO y las infecciones por el virus del dengue o el virus de la encefalitis de St Louis (SLE), y también se puede utilizar para diferenciar entre la vacunación por flavivirus y la infección natural por el VNO, así como entre infecciones recientes y antiguas (Wong et al., 2003). En cuanto a las limitaciones de estos métodos están relacionadas con la variedad de especies (incluso salvajes) que albergan las infecciones por el VNO. Los conjugados anti-especies no están disponibles para todos los hospedadores posibles (Dauphin & Zientara, 2007). Otra limitación de las pruebas ELISA, que ya se ha mencionado con anterioridad, es su dificultad para diferenciar específicamente el VNO de otros flavivirus, en particular de los virus de este mismo serocomplejo (VUSU). Por lo tanto, se está haciendo un esfuerzo considerable para desarrollar antígenos y/o formatos de prueba que puedan usarse para la detección específica de anticuerpos anti-VNO (de Filette et al., 2012). Estos también deben tener en cuenta la heterogeneidad de los perfiles de anticuerpos humanos contra la infección por el VNO (Chabierski et al., 2014). Para solventar la limitación de las pruebas ELISA para diferenciar entre flavivirus, se propone el uso de las Partículas Similares a Virus (VLP, por sus siglas en inglés) que se obtienen a partir de prM y proteínas E auto ensambladas y tienen propiedades estructurales y

fisicoquímicas similares a las partículas virales maduras (Holmes et al., 2005). El uso de estas VLP permite una mayor especificidad y el mismo grado de sensibilidad para algunos flavivirus a las pruebas ELISA (Holmes et al., 2005). Este resultado puede deberse a una mejor calidad y purificación de las VLP y a la presencia de cantidades proporcionalmente mayores de proteína E en las preparaciones de VLP. Para mejorar aún más la diferenciación entre flavivirus, se sugiere la alteración genética de epítomos específicos (localizados principalmente en el dominio II de la proteína E) en estas VLP (Holmes et al., 2005).

Otras técnicas para la detección del VNO son la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), la detección de antígenos e inmunohistoquímica. La viremia suele ser detectable en pacientes humanos con fiebre del VNO durante los cuatro primeros días de la enfermedad (Goldblum et al., 1957). Sin embargo, la detección del virus o del ARN tiene sus limitaciones en el diagnóstico tardío (Lanciotti et al., 2000), puesto que la fase de viremia suele preceder a los signos clínicos, lo que dificulta la detección del virus tras el inicio de la enfermedad (Johnson et al., 2000).

La RT-PCR en tiempo real es un ensayo de detección del virus rápido y fiable a partir de una amplia variedad de muestras (Lanciotti et al., 2000). Además, combinado con la extracción automatizada de ARN, la RT-PCR en tiempo real es útil para el diagnóstico a gran escala (Ostlund et al., 2001). La RT-PCR en tiempo real se utiliza desde 2003 como método de cribado en seres humanos (Lanciotti et al., 2000) y, sobre todo, para el cribado a gran escala de mosquitos/aves en los EE. UU., como predictores del riesgo potencial de transmisión a los seres humanos (Kauffman et al., 2003). A pesar de que se han desarrollado métodos de PCR para detectar los dos linajes principales del VNO (Jiménez-Clavero et al., 2006), un primer estudio de evaluación de calidad externa (ECE) en 2006 reveló que muchos laboratorios tenían problemas para detectar genomas del linaje 2 del VNO (Niedrig et al., 2006), un problema de gran preocupación ya que los virus de los linajes 1 y 2 estaban circulando conjuntamente en Europa. En una segunda ECE en 2011, los laboratorios participantes ya habían mejorado significativamente en este aspecto (Linke et al., 2011). Por eso, la multiplexación por PCR es muy útil en este aspecto, desarrollándose métodos de PCR multiplex capaz de detectar y diferenciar los linajes 1 y 2 del VNO y el VUSU (del Amo et al., 2013). También es esencial que los métodos de PCR actuales se verifiquen y actualicen constantemente para determinar su sensibilidad e idoneidad para detectar cepas de VNO emergentes para así poder hacer frente a la variabilidad genética observada de las cepas europeas.

Otras pruebas que se pueden utilizar, aunque no son las más usadas en los programas de vigilancia, son la prueba de la inhibición de la hemaglutinización (IHA), que carece de inhibidores inespecíficos (Beaty et al., 1995) o la inmunohistoquímica, que sigue siendo una buena herramienta para la confirmación específica de la infección por el VNO en casos de encefalitis mortal o en la enfermedad de las aves, incluso cuando los antígenos

del VNO pueden estar presentes en bajas cantidades (Cantile et al., 2001). Se puede realizar a partir de diversos tejidos (Cantile et al., 2001; Jozan et al., 2003), pero su éxito depende de la calidad del mismo (Dauphin & Zientara, 2007).

Por último, el desafío en el diagnóstico es la diversidad del VNO en Europa y la necesidad de comprobar continuamente la eficacia de las pruebas de laboratorio existentes para la detección de nuevas cepas o anticuerpos contra ellas (Llorente et al., 2019). El principal desafío en la serología de VNO es desarrollar inmunoensayos de nueva generación que eviten las reacciones cruzadas con diferentes flavivirus y permitan una buena diferenciación de flavivirus, minimizando la necesidad de confirmación por la VNT (Llorente et al., 2019). Para eso, son necesarios grandes paneles de anticuerpos monoclonales bien caracterizados para diferentes epítomos flavivirales (Rizzoli et al., 2015). Sin embargo, estas técnicas requieren habilidades y equipos avanzados que no suelen estar disponibles en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico de rutina (Llorente et al., 2019). Por esta razón, las pruebas ELISA y VNT siguen siendo necesarias para el cribado y la confirmación en los programas de vigilancia del VNO (Llorente et al., 2019). En el campo veterinario, las pruebas serológicas que diferencian los individuos infectados de vacunados tampoco están disponibles, por lo que siempre que sea posible, la inclusión de diferentes tipos de antígenos en los inmunoensayos ayudaría a evitar falsos negativos debido a la heterogeneidad de las respuestas inmunes humorales al VNO (Llorente et al., 2019).

5.3. DISTRIBUCIÓN DE FLAVIVIRUS

En la actualidad, los flavivirus están distribuidos por todo el mundo e infectan hasta 400 millones de personas al año (Figura 4) (Pierson & Diamond, 2020). Entre estos virus ARN, el VNO adquiere especial relevancia por la cantidad de brotes epidémicos que ha producido en los últimos años a nivel mundial, tanto en seres humanos como en animales, (caballos y aves, principalmente). Es por ello por lo que es considerado como el arbovirus más extendido en el mundo (Madewell, 2020). En las últimas décadas ha cobrado una mayor importancia debido a su sorprendente capacidad de invadir nuevas zonas geográficas, causando en numerosas ocasiones brotes epidémicos de gran virulencia (WHO, 2020). Sin embargo, hay otros flavivirus como pueden ser el VUSU y el VBAG, en los que hay que poner el foco de atención, debido a que se están notificando cada vez más casos en personas y animales de distintas regiones del mundo (Pierson & Diamond, 2020).

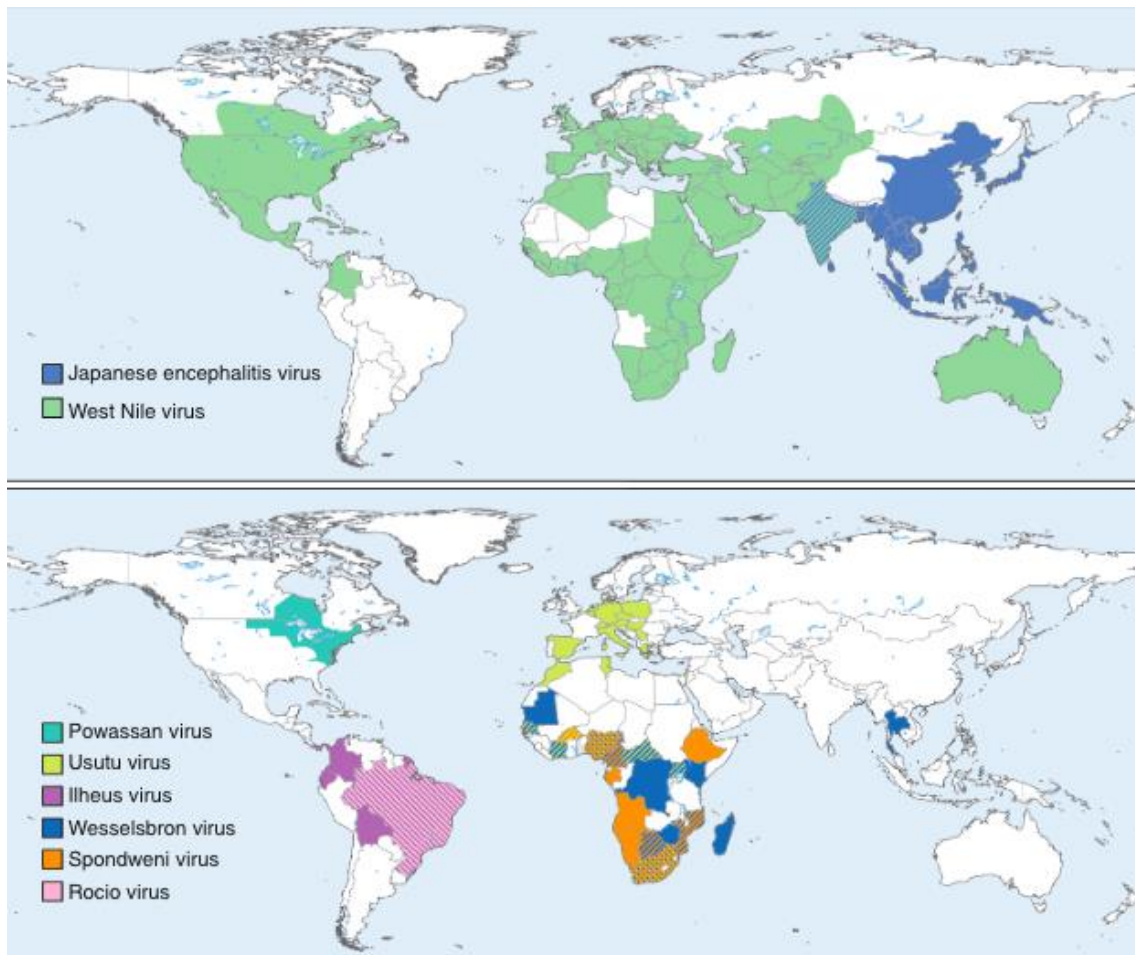


Figura 4. Distribución mundial de flavivirus donde se puede observar la situación del VNO (arriba) y en del VUSU (abajo) (Pierson & Diamond, 2020)

5.3.1. DISTRIBUCIÓN A NIVEL MUNDIAL

El VNO se ha convertido en uno de los flavivirus zoonóticos más distribuido a nivel mundial (Crosbie et al., 2008). Fue descrito por primera vez en 1937 en Uganda (Smithburn et al., 1940), aunque hasta los años 1990 no se registraron casos esporádicos en humanos en Israel, Australia, Oriente Medio y África (Murgue et al., 2001). Sin embargo, entre 1994 y 1999, se registró un brote grave en Argelia, Marruecos, Túnez, Italia, Francia, Rumania, Israel y Rusia (Rossi et al., 2010). Históricamente, el VNO causaba brotes puntuales de enfermedad febril en regiones de África, Oriente Medio, Asia y Australia que no se asociaban a ninguna enfermedad humana grave. Sin embargo, en la década de 1990, la epidemiología de la infección cambió, asociando los casos de Europa del Este a una enfermedad neurológica (Hubálek & Halouzka, 1999). En 1999, el VNO entró en Norteamérica y causó siete muertes en la zona de Nueva York, así como una gran mortalidad aviar y equina (Hubálek & Halouzka, 1999). En EE. UU., algunas especies aviares fueron especialmente vulnerables, registrándose un gran número de muertes de cuervos (*Corvus corax*), arrendajos (*Garrulus glandarius*) y halcones (*Falco* spp.) durante la epidemia. En las dos últimas décadas, el VNO se ha extendido y circulado en el territorio continental de EE. UU., así como en Canadá, México, el Caribe y Sudamérica (Figura 4). Debido al aumento del área de distribución, el número de casos humanos ha seguido aumentando: en los EE. UU., se confirmaron 51.747 casos entre 1999–2019 y más de 24.000 casos en équidos en un periodo de 10 años (Zeller & Schuffenecker, 2004; Pierson & Diamond, 2020). El 48% de estos casos en humanos causaron parálisis flácida aguda, meningitis y/o encefalitis y terminaron en 2.381 muertes. En 2020 se declararon 731 casos, en 2021 fueron 2911 casos y en 2022 se registraron 1035 casos, de los cuales 737 (71%) se clasificaron como enfermedad neuro invasiva (como meningitis o encefalitis) y 298 (29%) como enfermedad no neuro invasiva (CDC, 2021, 2023). Basándose en el análisis serológico realizado en donantes de sangre, es probable que se produjeran entre 2 y 4 millones de infecciones totales en los EE. UU. entre 1999 y 2010 (Petersen et al., 2013).

El VUSU también está dentro del grupo de las encefalitis japonesas, siendo detectado por primera vez en mosquitos del género *Cx. neavei* en Sudáfrica en 1959 (Woodall, 1964). A continuación, el VUSU apareció en 1996 en Italia (según un análisis retrospectivo) y en Europa Central en 2001, donde se asoció con muertes en poblaciones aviares (Weissenböck et al., 2002). En 2015–2016, se notificó una actividad generalizada del VUSU en Alemania, Francia, Austria, Bélgica y los Países Bajos, con mortalidad observada en mirlos (*Turdus merula*) y búhos grises (*Strix nebulosa*) (Cadar et al., 2017). La infección por VUSU también puede afectar a humanos y los estudios de seroprevalencia sugieren que puede ser mayor que la del VNO en áreas de co-circulación (Pierro et al., 2013). La enfermedad neuro invasiva en humanos causada por el VUSU parece menos común que la causada por el VNO, aunque existen informes de

meningoencefalitis, meningitis y parálisis en Burkina Faso y la República Central Africana (Nikolay et al., 2011; Gaibani & Rossini, 2017). Dado que el VNO y VUSU están relacionados (~76% de identidad de aminoácidos), la distinción serológica puede ser un reto y, por lo tanto, es posible que la infección y la enfermedad por VUSU estén subestimadas (Figura 5) (Pierson & Diamond, 2020).

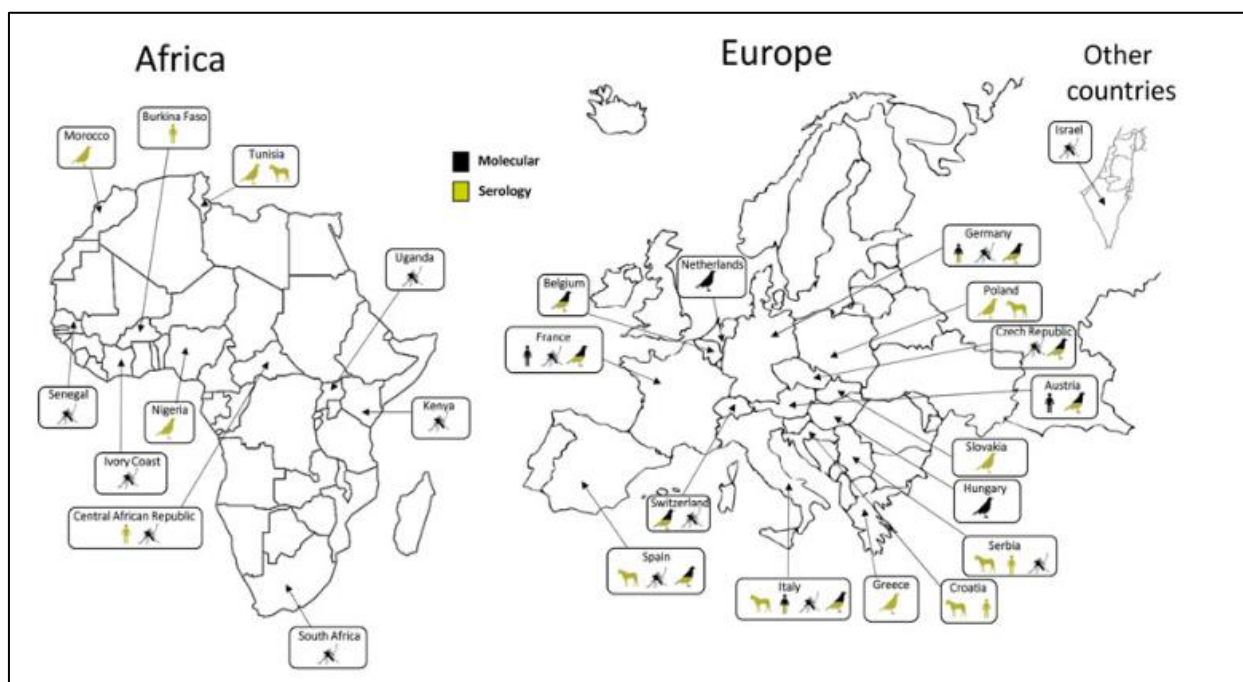


Figura 5. Distribución mundial del VUSU. Los símbolos indican en qué especie se ha detectado el VUSU (hombre, aves, mosquitos o caballos). El método de identificación (molecular o serológico) se indica en colores para cada especie (Clé et al., 2019)

En cuanto a la distribución mundial del VBA, se identificó por primera vez en la República Centroafricana en 1966, a partir de un grupo de mosquitos *Culex* spp. (Gould & Solomon, 2008). Posteriormente, el VBA se detectó en mosquitos *Culex* y *Aedes* spp. de otros países africanos (Camerún, Mauritania y Senegal) y asiáticos (India) (Traore-Lamizana et al., 1994; Diallo et al., 2005). En el caso de la India, el descubrimiento del VBA tuvo lugar durante las investigaciones sobre el brote de encefalitis de 1996 en el estado de Kerala (India), donde se aisló un arbovirus de un grupo de mosquitos *Culex tritaeniorhynchus*. Se caracterizó en un primer momento como un arbovirus perteneciente al serocomplejo de encefalitis japonesa, pero el análisis de la secuencia completa caracterizó el arbovirus como VBA con un 94,80% de identidad nucleotídica con la cepa africana del VBA DakAr B209 (Bondre, et al., 2009).

5.3.2. DISTRIBUCIÓN A NIVEL EUROPEO

Desde principios del siglo XXI, estos virus se han extendido por toda Europa a países como Italia, Hungría, Rumanía, Austria, Croacia, Chipre o España (Barrett, 2018).

En el caso del VNO, las encuestas epidemiológicas han demostrado su circulación desde la década de 1950 (Bardos et al., 1959). Sin embargo, el primer brote reconocido en humanos ocurrió entre 1962 y 1963 en la Camarga francesa (Joubert et al., 1970). En 1996, ocurrió la primera gran epidemia de infección por el VNO en Europa, durante la cual Rumania identificó alrededor de 400 casos (Tsai et al., 1998). Desde entonces, se han notificado casos y brotes en países del sur, este y oeste de Europa (ECDC, 2015, 2018). Entre 1996 y 2010 los brotes epidémicos fueron irregulares y limitados en el tiempo. En Francia, durante el año 2000 se detectaron ACs frente al VNO en équidos (Durand et al., 2002), en aves (Jourdain et al., 2007) y se confirmó su co-circulación en aves, mosquitos y caballos junto con el VUSU, recientemente (Constant et al., 2022). En Italia también se han detectado ACs en caballos (Autorino et al., 2002), en aves en co-circulación con VUSU (Llopis et al., 2015), en seres humanos también de forma conjunta del VNO y el VUSU (Pierro et al., 2013), y en mosquitos (Calzolari et al., 2020). En Alemania, se ha confirmado el VNO en caballos (Bergmann et al., 2022; Ganzenberg et al., 2022) y en aves, tanto salvajes como residentes, en circulación conjunta con el VUSU (Ziegler et al., 2012; Michel et al., 2019). También, en Grecia, se ha detectado el VNO en caballos (Bouzas et al., 2016), en mosquitos, tanto el linaje 1 como 2 (Papa et al., 2013; Patsoula et al., 2020) y en casos fatales de la forma neuro invasiva del VNO en seres humanos (Papa et al., 2010). En Hungría también se ha detectado el VNO en aves (Bakonyi et al., 2006; Erdélyi et al., 2007) y en seres humanos con co-circulación con VUSU (Nagy et al., 2019). En Croacia se ha detectado en seres humanos (Barbić et al., 2012) y en caballos (Barbic et al., 2013); así como en Portugal, en mosquitos (Esteves et al., 2005) y en caballos (Barros et al., 2011). En Eslovaquia también se ha detectado en caballos y en aves (Csank et al., 2018) y en Serbia en otros mamíferos como cerdos, jabalíes y corzos (Escribano-Romero et al., 2015).

En Europa el número de casos es más bajo que en otras regiones como Norteamérica (Murgue et al., 2001; Ward et al., 2006), aunque, durante el año 2018 se produjo el mayor brote originado por el VNO, con un total de 1503 casos humanos detectados en 11 países del continente europeo (Bergmann et al., 2022). También se produjo una alta transmisión entre caballos, con un total de 285 casos (ECDC, 2018). Aunque parece que en este brote el linaje dominante fue el 2, cabe resaltar que el linaje 1 también ha sido responsable de brotes, como el de España en 2020, con 77 casos humanos y 137 casos en équidos (ECDC, 2020; Ministerio de Sanidad, 2020.)

En el año 2022 en la Unión europea se han declarado 965 casos humanos de infección por VNO en Italia (586), Grecia (284), Rumania (46), Hungría (14), Alemania (11), Croacia (8), Austria (6), España (5), Francia (4) y Eslovaquia (1). Además, se han notificado 73 muertes, concentrándose en Italia (37), Grecia (31) y Rumanía (5). Los países vecinos de la UE han notificado 226 casos humanos de infección por el VNO en Serbia (226) y 12 muertes en Serbia (12). Por su parte, en el caso de équidos, se han notificado 93 casos distribuyéndose en Italia (44), Alemania (15), Grecia (9), Croacia (8), España (6), Francia (5), Hungría (3), Portugal (2) y Austria (1). Finalmente, también se han notificado 314 brotes entre aves, apareciendo en Italia (249), Alemania (51), España (9), Austria (2), Croacia (2) y Hungría (1) (Figura 6) (ECDC, 2022).

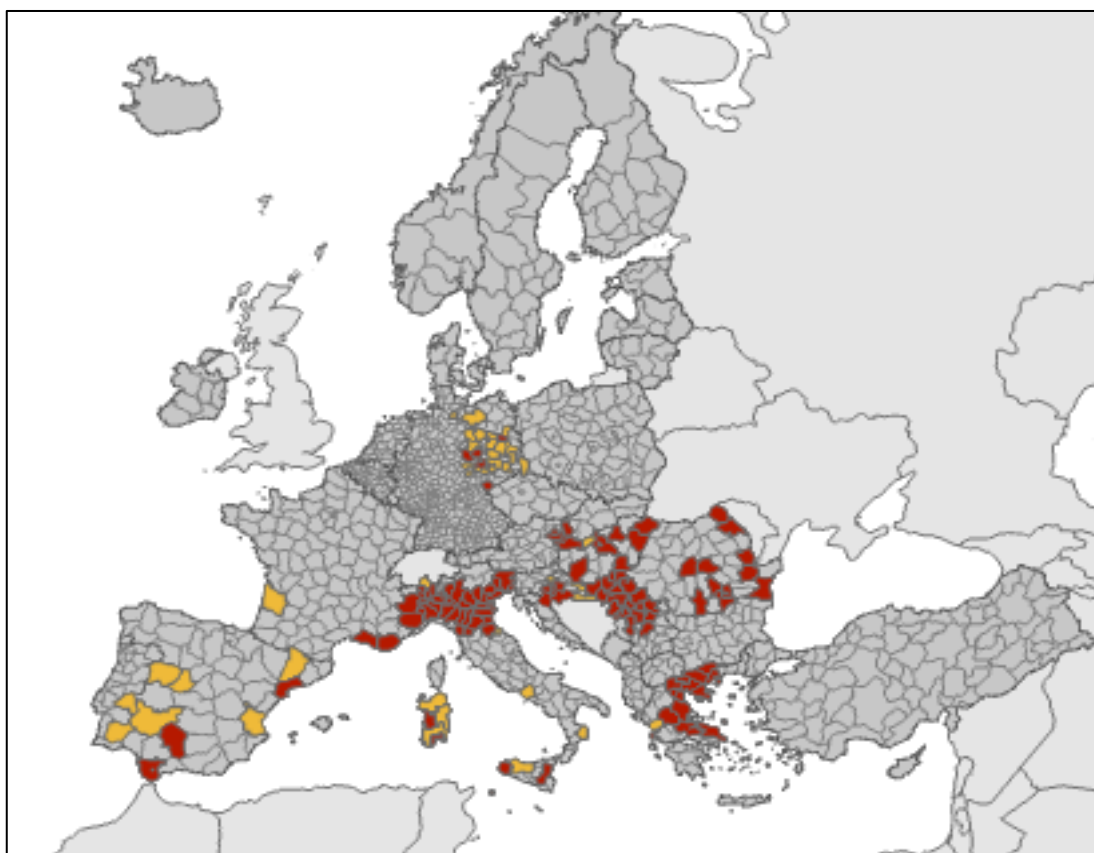


Figura 6. Casos notificados en UE/EEE en la temporada de transmisión 2022. En rojo aparecen los casos notificados en seres humanos y en naranja los casos notificados en animales (ECDC, 2022)

En cuanto a la distribución VUSU en Europa, algunos estudios retrospectivos destacan la posible circulación de este virus desde 1996 (Weissenböck et al., 1997). En 2001, en Austria, fue el agente causal de un brote de mortalidad masiva en distintas especies de aves como el Mirlo euroasiático (*Turdus merula*), la Golondrina común (*Hirundo rustica*) y el Búho gris (*Strix nebulosa*) (Weissenböck et al., 2002). Desde entonces, este virus se ha distribuido rápidamente por toda Europa, especialmente por la cuenca del mediterráneo, detectándose en países como Francia, Alemania, España, Italia, la República Checa, Hungría, Bélgica y los Países Bajos, causando brotes de

muertes masivas en aves salvajes (Bakonyi et al., 2007; Jöst et al., 2011; Llorente et al., 2013; Cadar et al., 2017; Eiden et al., 2018; Carletti et al., 2019; Hönig et al., 2019). El VUSU también se ha detectado en mosquitos y mamíferos, como caballos, perros, murciélagos, jabalíes o rumiantes salvajes (Cheng et al., 2018; Clé et al., 2019; Roesch et al., 2019.). En los humanos, ha sido identificado como el agente causal de algunos casos de enfermedades neurológicas en Austria, Italia y Hungría (Aberle et al., 2018; Carletti et al., 2019; Nagy et al., 2019), destacando aún más si cabe su potencial zoonótico y por ende su importancia para la salud pública.

Finalmente, el VBAG, a diferencia del VNO y del VUSU, los cuales están ampliamente distribuidos por todo el continente europeo, hasta el momento sólo ha sido identificado en España (Agüero et al., 2011) como se verá en el siguiente apartado.

5.3.3. DISTRIBUCIÓN A NIVEL ESPAÑOL

La historia del VNO en España indica que probablemente circuló en los años 70' en la zona del Delta del Ebro y otros lugares (Zeller & Schuffenecker, 2004; Chancey et al., 2015). Al igual que ocurrió en el resto de Europa meridional, tras aquella oleada de las décadas 60' y 70', el virus se dejó de detectar, para reemerger en diversos lugares de la cuenca mediterránea tiempo después. Sin embargo, no es hasta 2003, cuando se detectó actividad local del virus en aves silvestres del bajo Guadalquivir (Zeller & Schuffenecker, 2004; Chancey et al., 2015). Desde entonces, esa actividad no ha cesado de detectarse en España, incluyendo la detección del linaje 1, aunque también se ha detectado el linaje 2 y secuencias de ARN próximas al linaje 4, en mosquitos de Huelva y en Cataluña en 2006 y en 2017, respectivamente (García-Bocanegra et al., 2011a; Gamino & Höfle, 2013; Busquets et al., 2019). En 2004 se declaró el primer caso humano diagnosticado de enfermedad por el VNO en nuestro país, concretamente en una persona diagnosticada en Cataluña, pero que había estado de vacaciones durante el periodo inmediatamente anterior a su diagnóstico en un pueblo de Badajoz (Kaptoul et al., 2007). El primer aislamiento del virus se realizó en 2007 en dos águilas reales (*Aquila chrysaetos*) enfermas localizadas en Castilla-La Mancha (Jiménez-Clavero et al., 2008). Los primeros mosquitos positivos al virus se detectaron en la zona del bajo Guadalquivir-Odiel en 2008 (Vázquez et al., 2011b). Pero la eclosión definitiva ocurrió el 10 de septiembre de 2010, cuando se declararon los primeros focos de enfermedad equina por el VNO en la provincia de Cádiz, concomitante con 2 casos humanos en la misma zona (De la Calle et al., 2012).

Desde entonces, todos los años se vienen declarando casos equinos en el suroeste de Andalucía, entre finales de agosto y noviembre (temporada de transmisión) (MAPA, 2022). En diferentes estudios, se ha detectado este virus en aves y mosquitos del sur de España (López et al., 2008; Vázquez et al., 2010; Vázquez et al., 2011b; Llorente et al., 2013; Ferraguti et al., 2016) y en caballos en el centro y sur de España, incluido el Parque de Doñana (Jiménez-Clavero et al., 2010; García-Bocanegra et al., 2011b; García-Bocanegra et al., 2012; Abad-Cobo et al., 2016, 2017; García-Bocanegra et al., 2018). También se han detectado anticuerpos en otros mamíferos y en animales de zoológico (Gutiérrez-Guzmán et al., 2012; García-Bocanegra et al., 2016; García-Bocanegra, Jurado-Tarifa, et al., 2018; Caballero-Gómez et al., 2020).

En la mayoría de los casos notificados en caballos y aves, así como en los estudios de seroprevalencia y vigilancia entomológica realizados en nuestro país ha sido detectado el linaje 1 del VNO (Jiménez-Clavero et al., 2007, 2010; García-Bocanegra et al., 2011b; Vázquez et al., 2011b). No obstante, el linaje 2 también se ha detectado en nuestro país en azores (*Accipiter gentilis*) en Cataluña (Busquets et al., 2019).

En la temporada del año 2020, en España se notificaron 77 casos humanos (71 en Andalucía y 5 en Extremadura) y 8 muertes (García San Miguel et al., 2020; MAPA, 2022). Por lo tanto, podemos considerar al VNO como endémico, principalmente en el sur del país, debido a las condiciones favorables de estas zonas para el mantenimiento y circulación del virus (Sánchez-Gómez et al., 2017). A continuación, en este mapa en el que parecen los municipios en los que se ha detectado casos en humanos y focos en equinos y aves, podemos observar los últimos casos detectados del VNO en España (Figura 7).

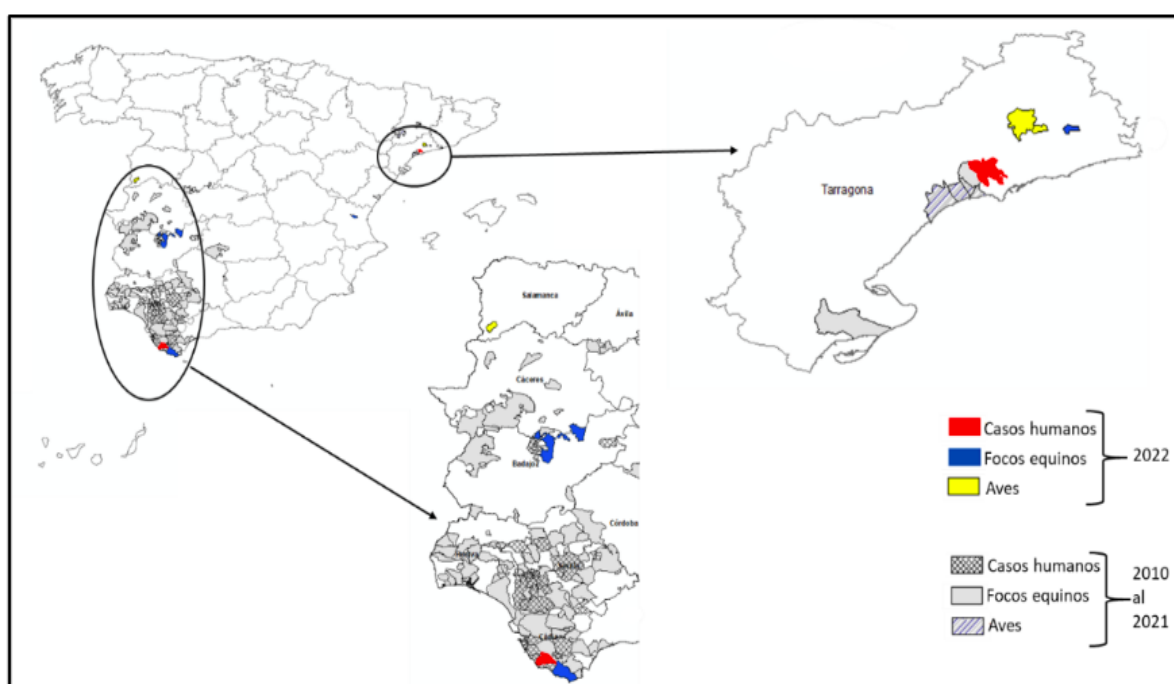


Figura 7. Municipios con casos acumulados en humanos y focos equinos y focos en aves durante las temporadas 2010-2022 en España (Saravia Campelli et al., 2022)

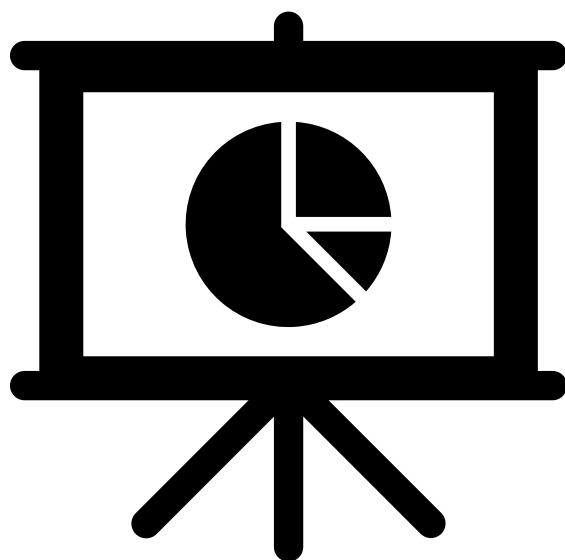
Estudios de seroprevalencia que se han realizado en Mallorca, han encontrado que alrededor del 6,4% de los équidos analizados presentaban anticuerpos frente al VNO (Vanhomwegen et al., 2017). Del mismo modo, en el Parque de Doñana (Huelva) se detectó una seropositividad del 8,3% y 2,6%, en 2005 y 2007, respectivamente, en caballos silvestres (Jiménez-Clavero et al., 2007, 2010). García-Bocanegra et al. (2012) observaron que el 7,1% de los caballos en diferentes zonas de Andalucía presentaron anticuerpos frente al VNO. En el centro de España, el 1,3% de los caballos fueron seropositivos frente al VNO (Abad-Cobo et al., 2017).

En el caso del VUSU, se ha demostrado su circulación en España al detectarlo en mosquitos *Cx. pipiens* en pantanos y humedales en Cataluña (Busquets et al., 2008) y también en mosquitos del género *Cx. perexiguus* (Vázquez et al., 2011b), además de en

zorzales (*Turdus philomelos*) en el sur de España en 2012 (Höfle et al., 2013). Por último, anticuerpos frente al VUSU han sido detectados también en España en caballos (Vanhomwegen et al., 2017), en ciervos (García-Bocanegra et al., 2016) y aves autóctonas (Figuerola et al., 2007; Höfle et al., 2013; Llorente et al., 2013; Ferraguti et al., 2016; Jurado-Tarifa et al., 2016).

Finalmente, en algunos estudios en el sur de España, se han detectado anticuerpos frente al VBAG en la perdiz roja (*A. rufa*) y faisanes (*P. colchicus*) en la provincia andaluza de Cádiz, identificando a este flavivirus como el causante del brote epidémico en estas especies que tuvo lugar en 2010 en estas dos especies (Agüero et al., 2011), no habiendo sido detectado en otras regiones de España (Llorente et al., 2013). En 2019, volvió a ser detectado en perdices rojas (*A. rufa*) coinfectadas con el VBAG y *Plasmodium* spp. (Höfle et al., 2022).

RESULTADOS



6. RESULTADOS

6.1. RESULTADOS PUBLICADOS

6.1.1. Serological evidence of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids from Western Spain

Fátima Guerrero-Carvajal¹, Daniel Bravo-Barriga^{1*}, María Martín-Cuervo², Pilar Aguilera Sepúlveda³, Martina Ferraguti⁴, Miguel Ángel Jiménez-Clavero^{3,5}, Francisco Llorente³, Juan Manuel Alonso¹, Eva Frontera¹

¹ Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura (Uex), Cáceres, España

² Departamento de Medicina Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura (Uex), Cáceres, España

³ Centro de Investigación de Sanidad Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA-CISA), Valdeolmos, Madrid, España

⁴ Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología, Facultad de Biología, Universidad de Extremadura (Uex), Badajoz, España

⁵ Centro de Investigación Biomédica en la Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, España

*Autor de correspondencia

Transboundary and Emerging Diseases 2021. 68(3)

DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.13810>

Factor de impacto, cuartil y categoría: 4.521/Q1/Veterinary sciences

Posición categoría: 75/145

Artículo publicado online con acceso restringido pero que se cuenta con la aprobación de la revista para poder publicarlo en los resultados de la presente tesis doctoral (ANEXOS, 129).

Resumen

El Virus del Nilo occidental (VNO) es un flavivirus transmitido por mosquitos y está ampliamente distribuido por Europa, pudiendo causar complicaciones neurológicas, tales como meningoencefalitis o encefalitis en seres humanos, équidos y aves. En España, se ha detectado su circulación tanto en mosquitos, aves y caballos en diferentes regiones, pero nunca había sido estudiado en profundidad en la región de Extremadura. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar la presencia y distribución del VNO en équidos en la región extremeña, incluyendo también algunas zonas de provincias fronterizas, como Huelva, Salamanca y Toledo. Además, se analizó la posible presencia de otros flavivirus, como el VUSU y los posibles factores de riesgo asociados con infecciones causadas por ambos.

Entre 2018 y 2019, se recogieron muestras de sangre de 766 équidos mediante venopunción de la vena yugular (743 caballos, 6 mulos y 17 burros), de los cuales 41 habían sido vacunados previamente contra el VNO, siendo excluidos del estudio. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1000 g durante 10 min a 4 °C dentro de las siguientes 24 h después de la recolección, y el suero se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis (Kit INGEZIM West Nile IgM, y kit INGEZIM West Nile COMPAC, Ingensa, España). Todos los sueros positivos o dudosos fueron consecutivamente analizados mediante pruebas de neutralización viral (VNT) para su confirmación. Se llevó a cabo una micro-VNT frente al VNO (VNO Eg-101, GenBank nº de acceso AF260968) y frente al VUSU (VUSU SAAR-1776, GenBank® nº de acceso AY453412).

De los 725 équidos incluidos en el estudio, 199 presentaron anticuerpos contra el VNO en el análisis serológico mediante la técnica ELISA de competición (kit INGEZIM West Nile COMPAC, Ingenasa, España) (27,45%), mientras que 22 fueron dudosos (3,03%). Por su parte, fueron detectados anticuerpos IgM (Kit INGEZIM West Nile IgM, Ingensa, España) contra el VNO en 16 caballos (2,21%) y en 3 animales el resultado fue dudoso (0,41%). Todos estos sueros, tanto positivos como dudosos, fueron analizados mediante pruebas de neutralización viral (VNT) para su confirmación. Se llevó a cabo una micro-VNT frente al VNO (VNO Eg-101, GenBank nº de acceso AF260968) y frente al VUSU (VUSU SAAR-1776, GenBank® nº de acceso AY453412). Además, de uno de los équidos con sintomatología que murió a los pocos días de la extracción de sangre, los tejidos recogidos (bazo, pulmón, hígado, corazón, riñón, cabello, cerebro y cerebelo) durante la necropsia fueron sometidos a una PCR-RT para aislar e identificar el linaje del VNO. Se confirmaron como positivos un total de 143 caballos, lo cual arroja una seroprevalencia global del 19,72%. Además, se corroboraron anticuerpos específicos contra el VUSU en 11 muestras. Sin embargo, en 24 équidos no fue posible determinar la especie de flavivirus específica implicada. Se confirmaron como positivos un total de 143 caballos, lo cual arroja una seroprevalencia global del 19,72%. Además, se corroboraron anticuerpos específicos contra el VUSU en 11 muestras. Sin embargo, en

24 équidos no fue posible determinar la especie de flavivirus específica implicada. En el caballo fallecido con sintomatología nerviosa, se detectó en el cerebro y cerebelo el linaje 1 del VNO.

En cuanto a los factores de riesgo asociados con la seroprevalencia de VNO y VUSU en équidos de las áreas estudiadas, los modelos de efectos mixtos lineales generalizados mostraron que la edad (mayor seroprevalencia en adultos que jóvenes) y el tipo de capa (los de capas claros mostraron mayor prevalencia que los de capas oscuras) fueron los factores que mayor influencia tuvieron en dicha seroprevalencia. En el caso del VUSU el único factor que estuvo relacionado fue la raza, ya que en razas puras la seroprevalencia del VUSU fue mayor que en caballos cruzados, especialmente en caballos pura sangre inglés y pura raza árabe.

Nuestros hallazgos reflejan el alto contacto del VNO con équidos de Extremadura y regiones adyacentes, mostrando unos niveles mucho mayores en esta región que en otros estudios realizados hasta la fecha en otras zonas de nuestro país. La presencia de caballos con anticuerpos anti-IgM frente a VNO confirmó una circulación activa del virus entre los équidos del oeste de España en 2018 y 2019. Se constata también la co-circulación de los VNO y VUSU en estas áreas. Con estos resultados observados, está claro que en toda la zona de estudio deben fomentarse los programas de vacunación equina para reducir el riesgo de VNO, puesto que tan sólo el 5,25% de los équidos muestreados estaban vacunados frente al VNO; así como mejorar los protocolos de vigilancia de Salud Pública para detectar casos en humanos de encefalitis o meningoencefalitis no diagnosticados.

Serological evidence of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids from western Spain

Fátima Guerrero-Carvajal¹  | Daniel Bravo-Barriga¹  | María Martín-Cuervo²  |
Pilar Aguilera-Sepúlveda³  | Martina Ferraguti⁴  | Miguel Ángel Jiménez-Clavero^{3,5}  |
Francisco Llorente³  | Juan Manuel Alonso¹  | Eva Frontera¹ 

¹Animal Health Department, Veterinary Faculty, University of Extremadura (UEX), Cáceres, Spain

²Animal Medicine Department, Veterinary Faculty, University of Extremadura (UEX), Cáceres, Spain

³Animal Health Research Centre, National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA-CISA), Valdeolmos, Madrid, Spain

⁴Anatomy, Cellular Biology and Zoology Department, Science Faculty, University of Extremadura (UEX), Badajoz, Spain

⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain

Correspondence

Daniel Bravo-Barriga, Animal Health Department, Veterinary Faculty, University of Extremadura (UEX), Cáceres, Spain.
Email: dbravoparasit@unex.es

Funding information

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Grant/Award Number: E-RTA2015-00002-C02-00; Regional Ministry of Economy and Infrastructure, Extremadura Government and the European Regional Development Fund 'A way to make Europe', Grant/Award Number: IB16135

Abstract

West Nile virus (WNV) is a mosquito-borne emerging virus in Europe with capacity to cause neurological complications such as encephalitis or meningoencephalitis in humans, birds or equids. In Spain, WNV is actively circulating in mosquitoes, birds and horses in different regions, but never has been deeply studied in Extremadura. Therefore, the aim of this study was to evaluate the seroprevalence of WNV in equids of those areas and to analyse the risk factors associated with exposure to the virus. A total of 199 out of 725 equids presented antibodies against WNV by competition ELISA (27.45%), while 22 were doubtful (3.03%). Anti-WNV IgM antibodies were detected in 16 equids (2.21%), and 3 animals were doubtful (0.41%). All ELISA-reactive positive/doubtful sera ($N = 226$) were further tested by micro-virus neutralization test (VNT), and a total of 143 horses were confirmed as positive for WNV, obtaining a seroprevalence of 19.72% in equids of western Spain. In addition, specific antibodies against USUV were confirmed in 11 equids. In 24 equids, a specific flavivirus species (detected by ELISA test) could not be determined. The generalized linear mixed-effects models showed that the significant risk factors associated with individual WNV infection in equids were the age (adults) and hair coat colour (light), whereas in USUV infections, it was the breed (pure). Data demonstrated that WNV and USUV are circulating in regions of western Spain. Given the high WNV seroprevalence found in equids from the studied areas, it is important to improve the surveillance programmes of public health to detect undiagnosed human cases and to establish a vaccination programme in equid herds in these regions.

KEYWORDS

Flavivirus, horses, risk factors, seroprevalence, vector-borne pathogens

1 | INTRODUCTION

West Nile virus (WNV) is a mosquito-borne zoonotic agent belonging to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae* (Angenvoort, Brault, Bowen, & Groschup, 2013). Mosquitoes are the vectors and birds

are the main reservoir. Mammals, such as humans and equids, are generally considered dead-end hosts, as viraemia resulting from WNV infection is insufficient to contribute to the amplification cycle (Bunning et al., 2002; Sotelo, Fernández-Pinero, & Jiménez-Clavero, 2012). WNV infections rarely result in clinical disease

but can occasionally cause outbreaks that seriously affect animals and human health (Beck et al., 2013). Although the incidence of WNV has been estimated to be below 10% in equids, mortality rates can approach 50% among those that present clinical disease (Angenvoort et al., 2013).

Antibodies against WNV have been detected in equids from different Spanish regions. In Majorca Island, a study of seroprevalence showed a seropositivity rate of 6.4% to WNV (Vanhomwegen et al., 2017). In Doñana National Park (Huelva), south-west Spain, WNV seropositivities of 8.3% and 2.6% were detected in 2005 and 2007, respectively, in feral horses (Jiménez-Clavero et al., 2010; Jiménez-Clavero, Tejedor, Rojo, Soriguer, & Figuerola, 2007). García-Bocanegra et al. (2012) found that 7.1% of the horses of different Andalusian provinces (southern Spain) presented serological evidence of infection by WNV. In central Spain, 1.35% of horses were WNV-seropositive (Abad-Cobo et al., 2017).

Phylogenetic analysis revealed that WNV strains are grouped into nine genetic lineages, with lineage 1 and lineage 2 currently associated with disease outbreaks (Christova et al., 2020; Petersen, Brault, & Nasci, 2013). Prior to 2004, only lineage 1 strains were detected in animals and humans in Europe (Zeller & Schuffenecker, 2004). Lineage 2 was first isolated in 2004 in Hungary and Russia; since then, this lineage has dispersed to eastern, central/southern European countries, causing hundreds of cases in humans, birds and horses (Hernández-Triana et al., 2014; de Heus et al., 2019; Ravagnan et al., 2015; Rizzoli et al., 2015; Savini et al., 2012). Currently, lineage 2 predominates in Europe in different species (Vilibic-Cavlek et al., 2019). In Spain, WNV outbreaks in horses have been detected since 2010 until 2019 (European Centre for Disease Prevention & Control, 2019; García-Bocanegra et al., 2012, 2018), produced mainly by lineage 1 (García-Bocanegra et al., 2011; Ministerio de Agricultura, 2019). However, WNV lineage 2 has also been detected in Catalonia (northern Spain) in northern goshawks (*Accipiter gentilis*) (Busquets et al., 2019) and in mosquitoes (Busquets, Alba, Allepuz, Aranda, & Núñez, 2008; Vázquez et al., 2011).

Usutu virus (USUV) was firstly identified in Europe in 2001, when it was determined to be the causative agent of a mass mortality event in birds (Weissenböck et al., 2002). According to several studies, USUV seems to be actively circulating in mosquitoes, birds and horses from different regions of Spain (Ferraguti et al., 2016; Höfle et al., 2013; Jurado-Tarifa et al., 2016; Llorente et al., 2013; Vázquez et al., 2011; Roiz et al., 2019) but there is no information about it in the Extremadura region and other bordering areas.

The objective of this study was to assess the presence and distribution of WNV seropositivity in equids from western Spain, including the provinces of Badajoz and Cáceres and bordering areas of Huelva, Salamanca and Toledo. The study also analyses the possible presence of USUV in those areas and the different risk factors associated with WNV and USUV infections in horses.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Study design and data collection

A cross-sectional survey was carried out in 2018 and 2019 to analyse the seroprevalence of WNV in equid herds from western Spain, including mainly the provinces of Badajoz and Cáceres and some herds of Huelva, Salamanca and Toledo. In addition, few samples ($N = 2$) from 2017 were also added to the analysis. This area is characterized by a continental Mediterranean climate, with hot and dry summers and mild winters.

The sample size was estimated using Win Episcope 2.0 (www.winepi.net) with an expected prevalence of 8% (according to previous studies in Spain) and an expected error of 2.5%. In 2018, the equine census in studied area was approximately 40,569 animals (Ministerio de Agricultura, 2019). The calculated sample size was 453. We increased up to 766 serum samples to have enough samples representing the different areas.

Blood samples were collected from equids (743 horses, 6 mules and 17 donkeys), of which 41 had been previously vaccinated against WNV. Blood samples were centrifuged at 1,006 g for 10 min at 4°C within the next 24 hr after collection, to separate the serum, which was stored at -20°C until further analysis. Vaccinated animals were excluded from the study.

For each sampled animal, an accompanying form with information of the farm and the location, as well as on the animal (age, vaccination status, movements, among others), was filled. One animal died one week after taking the blood sample, and the animal was necropsied. Different tissues were analysed for the presence of WNV and USUV by multiplex real-time RT-PCR as detailed in 'Viral genome detection assays' section.

2.2 | Antibody detection assays

2.2.1 | ELISA tests

Serum samples were tested by two commercial ELISA kits for the presence of WNV total antibodies (INGEZIM West Nile Compac, Ingenasa, Spain) and WNV-specific IgM (INGEZIM West Nile IgM, Ingenasa, Spain) following the manufacturer's instructions. Positive and doubtful sera in ELISA tests were then confirmed for WNV-specific antibodies by using a micro-virus neutralization test (VNT), performed as described below.

2.2.2 | Virus-neutralization test (VNT)

West Nile virus-neutralizing antibodies were titrated by VNT, the OIE (World Organization for Animal Health)-prescribed gold standard method for serological diagnosis of WNV, using 96-well microtitre plates as previously described (Llorente et al., 2019). VNTs were performed in parallel against WNV strain Eg-101 (GenBank accession no.

AF260968) and USUV SAAR-1776 (GenBank accession no. AY453412), in order to differentiate specific neutralizing antibody responses against these two different flaviviruses that are known to cross-react in the ELISA tests, and probably co-circulate in the studied area. Neutralizing immune response was assigned as specific for the virus giving VNT titre at least fourfold higher than the titre obtained for the other virus (Calisher et al., 1989). When titre differences did not reach this threshold, the result was considered inconclusive and the virus which caused the infection was considered an undetermined flavivirus.

2.3 | Viral genome detection assays

2.3.1 | Nucleic acid extraction

Viral RNA was extracted from tissue homogenates (blood, hair, serum, spleen, lung, brain, cerebellum, heart, liver and kidney), using a previously described method (Pérez-Ramírez et al., 2017).

2.3.2 | Real-time RT-PCR

Viral genome load was measured by real-time RT-PCR, using a previously described method that detects and differentiates lineage 1 WNV, lineage 2 WNV and USUV in a single reaction (del Amo et al., 2013). Lineage 1 WNV (NY99 strain), lineage 2 WNV (B956 strain) and USUV (SAAR strain) RNAs were included as positive controls in RT-PCR assay obtaining an expected Ct value of 30 ± 2 for each target. Negative controls, without detectable Ct value, were also included. Samples with Ct value >40.00 were considered negative.

2.4 | Statistical analysis

Descriptive statistics with frequencies and percentages were generated for each of the pathogen identified. The prevalence of antibodies against WNV, USUV and other flaviviruses was estimated with the exact binomial confidence intervals of 95%. Generalized linear mixed-effects models (GLMM) with a 'logit' link function and binomial distribution were used to investigate which risk factors were associated with WNV and USUV seroprevalence in equids from the studied areas. Separate models were fitted for each virus. The infection status of each individual (infected or uninfected) for each virus was included as the dependent variable, while gender (male and female), age (young: <5 years; adult: 5–20 years; and geriatric: >20 years), breed (crossbreed, purebred and other equids), body score (according to Henneke scale: thin: <4 ; moderate: 4–7; and fat: >7), colour (light and dark), type of housing (stall, pasture and mix), aptitude (leisure sport and reproduction), competition (yes and not), water (presence or absence of at least one pond within a 100 m radius from the herd), hypersensitivity to insect bites (yes and not), size of herd (small: <5 ;

medium: 6–19; and big: >20) and seasons (spring, summer, autumn and winter) were included as categorical independent explanatory variables. The province, the equid exploitation nested in province and the year of sampling were included as random factors to account for the temporal and geographical stratification of the sampling design. The chi-square tests were calculated using an ANOVA type III, and post hoc analyses were performed using Tukey contrasts test when necessary. For each GLMM, we tested the collinearity between independent variables by using the variance inflation factor (VIF) (Zuur, Ieno, & Elphick, 2010). The GLMM overdispersion was checked using the Pearson statistic (ratio of the Pearson chi-square to its degrees of freedom), a common method used for assessing the deviance of goodness-of-fit statistics (Rodríguez, 2010). We found no evidence of collinearity between the variables included in the models or of overdispersion, as the Pearson dispersion statistics were always close to 1. All statistical analyses were conducted in R (v. 3.6.3; The R Foundation for Statistical Computing Platform 2020) using the packages: arm, car, lme4, MuMIn, multcomp, MASS, Matrix, Rcpp and stats.

3 | RESULTS

The cross-sectional study included 725 equids. Overall, 199 (27.45%, 95% CI: 24.26%–30.88%) presented antibodies to WNV by competition ELISA, while 22 (3.03%, 95% CI: 2.01%–4.55%) were doubtful. Anti-WNV IgM antibodies were detected in 16 equids (2.21%, 95% CI: 1.36%–3.55%), and 3 animals yielded doubtful results in this IgM assay (0.41%, 95% CI: 0.14%–1.21%) (Table 1).

Serologically positive and doubtful sera (including IgM) ($N = 226$) were subjected to VNT, confirming the presence of anti-WNV-specific antibodies in 143 equids (63.27%). Therefore, the actual WNV seroprevalence in equids from our study was 19.72% (95% CI: 16.66%–22.78%). The VNT also showed that 11 equids, positive or doubtful by ELISA tests, were positive for USUV (1.52%, 95% CI: 0.85%–2.70%) and other 24 positive/doubtful animals gave VNT titres that did not allow to differentiate between WNV and USUV antibody responses, thus being considered as infections by undetermined flavivirus (3.31%, 95% CI: 2.23%–4.88%) (Table 1).

In horses showing WNV-specific antibodies, neutralizing titres against WNV ranged from 1:20 to $\geq 1:1,280$. The number and percentage of animals with NtAb against WNV according to each titre are shown in Table 1. The 40.5% of WNV-seropositive sera showed equal or higher than 1:320. Only one USUV-seropositive animal (out 11) showed a titre greater than 1:80 against USUV (Table 1).

At the herd level, 44 out of the 69 equine herds (63.77%; 95% CI: 51.98%–74.10%) had at least one WNV-seropositive animal, confirmed by VNT.

The distribution of positive herds to WNV, USUV or undetermined flaviviruses is represented in Figure 1. Herds with seropositive

TABLE 1 Total of positive and doubtful individuals according to ELISA test (competition and IgM; $N = 725$) and VNT ($N = 226$) techniques. Titres obtained by VNT in samples with WNV- and USUV-specific antibodies are shown

	ELISA		VNT		
	No of WNV-positive (%)	No of WNV doubtful (%)	No of WNV ^a (%)	No of USUV ^a (%)	No of undetermined flaviviruses ^a (%)
Competition	199 (27.45)	22 (3.03)	143 (19.72)	11 (1.52)	24 (3.31)
IgM	16 (2.21)	3 (0.41)			
No of individuals with specific neutralizing Abs according to VNT titres (%)					
Titres	WNV		USUV		
1:10	0 (0)		2 (18.18)		
1:20	12 (8.39)		5 (45.45)		
1:40	13 (9.09)		1 (9.09)		
1:80	31 (21.67)		2 (18.18)		
1:160	29 (20.28)		1 (9.09)		
1:320	26 (18.18)		0 (0)		
1:640	22 (15.28)		0 (0)		
≥1:1,280	10 (6.99)		0 (0)		

^aThe percentage represents the individuals with specific WNV and USUV antibodies or with undetermined flaviviruses detected by VNT.

animals to WNV and USUV were distributed throughout the areas of study, including the provinces of Cáceres and Badajoz and close areas in Toledo and Huelva.

There were 13 horses with neurological signs compatible with WNV within 3 months prior to sampling, among which 5 were WNV-seropositive by IgM and competition ELISA, 4 were only seropositive by competition ELISA, and 4 were negative by both ELISA kits. Eight out of 13 horses with signs had neutralizing antibodies against VNT. The analysis of the sera obtained in these horses by RT-PCR was negative. One of the symptomatic horses died one week after blood sampling, and different tissues (spleen, lung, liver, heart, kidney, hair, brain and cerebellum) were collected at necropsy and analysed by RT-PCR. WNV lineage 1 RNA was detected in brain and cerebellum.

Prevalence of antibodies against WNV, USUV or undetermined flaviviruses depending upon different conditions (age, hypersensitivity to insect bites, aptitude, breed, body score, hair coat colour, competition, gender, presence of water, season, size of herd and type of housing) is shown in Table 2.

A total of 12 explanatory variables were tested in the statistical analysis. The GLMM showed that the significant risk factors associated with the individual risk of infection by WNV were as follows: age and hair coat colour (Table 3). Briefly, young equids showed less WNV seroprevalence than adults (Tukey post hoc test: estimate ($\pm$ SE) = -0.76 ± 0.27 , $z = -2.83$, $p < .001$). Also, dark hair coat animals presented less WNV antibodies than light individuals (-0.41 ± 0.20 , $z = -2.04$, $p = .04$). No significant association was found with other risk factors (Table 3).

The analysis of risk factors for USUV infection is showed in Table 4. Thereafter, purebred horses showed higher levels of infection than crossbreed (Tukey post hoc test: estimate ($\pm$ SE) = 1.56 ± 0.77 , $z = 2.02$, $p = .04$).

4 | DISCUSSION

In this study, the seroprevalence observed for WNV in equids from western Spain was 19.7%, higher than observed in previous reports of the same kind in Spain, for example 8.3% WNV seropositivity in feral horses tested in Huelva between 2005 and 2008 (Jiménez-Clavero et al., 2010), and some years later, a 7.1% overall seroprevalence in equids from different provinces of Andalusia (south of Spain) (García-Bocanegra et al., 2012). Similar results were obtained in the Balearic Islands by Vanhomwegen et al. (2017), where 6.6% of horses showed antibodies against WNV. Between 2011 and 2013, a much lower seroprevalence was found in horses from central Spain (1.35%) (Abad-Cobo et al., 2017). In Portugal, the bordering country of the studied area, an analysis in 1,313 horses' serum samples showed a prevalence of 3% (Barros et al., 2011). In other Mediterranean countries, the prevalence was 31.1% in Morocco (Benjelloun et al., 2017), 17.4% in Algeria (Lafri et al., 2017), 8.5% in southern France (Durand et al., 2002) or 3.43% in Croatia (Barbić et al., 2012).

Although some of these different studies used different sampling or testing methodologies that could partially explain the differences observed in seroprevalence results, this cannot explain the great differences observed in previous studies from neighbouring areas of Spain, with comparable methodologies employed. Therefore, other factors may be implicated in the high WNV presence in the western areas of Spain, especially in the Extremadura region. In 2004, the first human case of WNV in Spain was reported from a resident of Barcelona, who was infected in Badajoz, one of the provinces included in this study (Kaptoul et al., 2007). Besides, WNV outbreaks in equids have been reported in this area since 2015 (Ministerio de Agricultura, 2019). It might occur that WNV circulation in this region

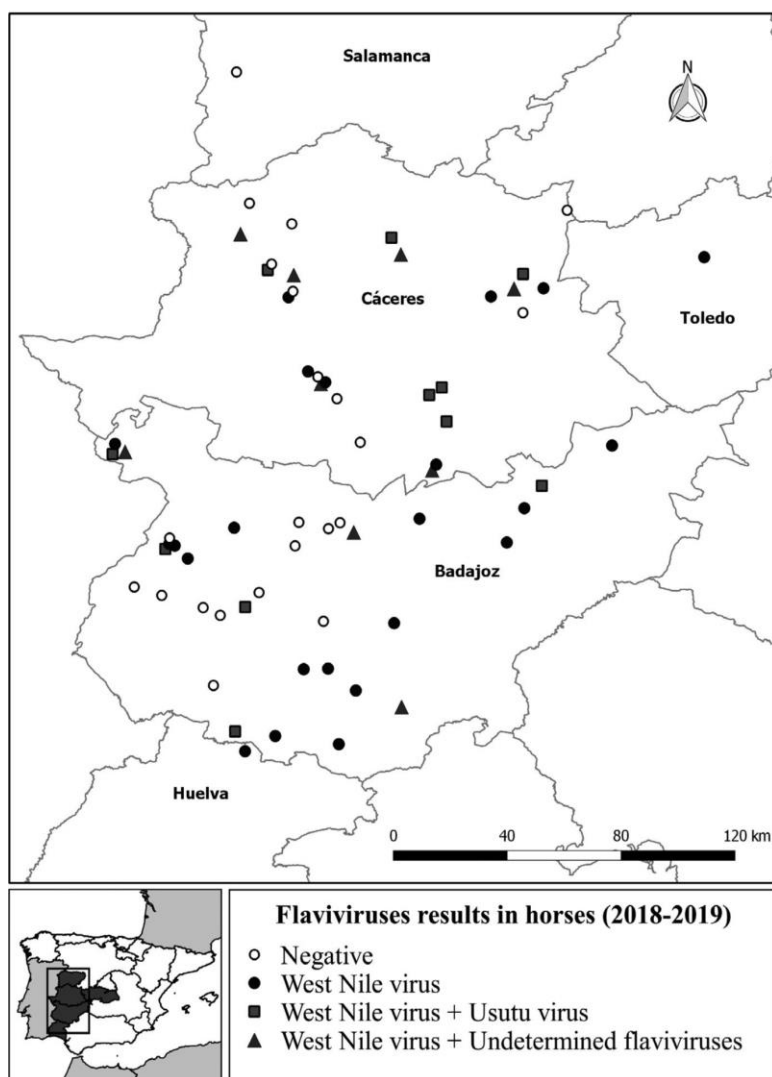


FIGURE 1 Distribution of flaviviruses in western Spain based on the geographical origin of the equine herds analysed. Map created by QGIS 3.12.0 (2020). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.org>

has remained overlooked for years. This area presents favourable conditions for the maintenance and circulation of WNV. There are several natural areas included in the RAMSAR convention wetland and numerous natural protected areas with high density of birds and mosquitoes. On the other hand, the studied area is the Spanish region with the largest freshwater reserve of the country, which would facilitate the presence of competent vectors. The *Culex pipiens* s.l. mosquito species has been shown to be the main vector of WNV to equids in Europe (Martinet, Ferté, Failloux, Schaffner, & Depaquit, 2019). Previous studies have described *Cx. pipiens* as the most frequent and widespread mosquito species in Extremadura, followed by *Culex theileri* and *Culex univittatus* (Gangoso et al., 2020; Mixão et al., 2016), all of them highly competent vectors of WNV.

Finally, this study was carried out between 2017 and 2019. It is also important to point out that in Europe, the 2018 season was characterized by an unusual increase in the number of human and equid cases compared with records from previous years (see picture for

human cases at <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-west-nile-virus-transmission-season-europe-2018>). The most likely explanation for this trend is that weather conditions, elevated temperatures and precipitation anomalies, and potentially other environmental factors, were favourable for the earlier and bigger expansion of the vector population (Aberle et al., 2018; Bakonyi et al., 2017). Apparently, this was not the case for Spain, and particularly for Extremadura and adjacent regions, where reported WNV cases did not differ significantly from previous seasons. Our data, however, support a more intense transmission season in 2018 and early 2019 in the surveyed area, pointing out a possible underestimation of cases in the official reports (see map at <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-outbreaks-among-equids-european-union-2018-transmission-season>). This study remarks the need for reinforcement of monitoring and surveillance programmes for WNV in this area implemented by public administrations, together with other support actions such as raising awareness, motivating and

TABLE 2 Frequency of antibodies against WNV, USUV and undetermined flaviviruses in equids from western Spain using ELISA and VNT

Variable	Categories	No of samples	No of WNV-positive (%)	No of USUV-positive (%)	No of undetermined flavivirus positive (%)
Age	Young	202	26 (12.87)	1 (0.49)	6 (2.98)
	Adult	419	95 (22.67)	9 (2.15)	14 (3.34)
	Geriatric	104	22 (21.15)	1 (0.96)	4 (3.85)
Hypersensitivity to insect bites	Yes	89	18 (20.22)	1 (1.12)	5 (5.62)
	No	636	125 (19.65)	10 (1.57)	19 (2.99)
Aptitude	Leisure and sport	529	103 (19.47)	8 (1.51)	17 (3.21)
	Reproduction	196	40 (20.41)	3 (1.53)	7 (3.57)
Breed	Crossed	332	67 (20.18)	3 (0.90)	11 (3.31)
	Other equidae	22	4 (18.18)	0 (0)	1 (4.55)
	Pure breed	371	72 (19.41)	8 (2.16)	12 (3.23)
Body score	Thin	49	12 (24.49)	2 (4.08)	1 (2.04)
	Moderate	572	111 (19.41)	6 (1.05)	19 (3.32)
	Fat	104	20 (19.23)	3 (2.88)	4 (3.85)
Hair coat colour	Light	366	84 (22.95)	5 (1.37)	11 (3.01)
	Dark	359	59 (16.43)	6 (1.67)	13 (3.62)
Competition	Yes	114	22 (19.30)	1 (0.88)	6 (5.26)
	No	611	121 (19.80)	10 (1.64)	18 (2.95)
Gender	Female	373	76 (20.38)	7 (1.88)	15 (4.02)
	Male	352	67 (19.03)	4 (1.14)	9 (2.56)
Presence of water	Yes	535	117 (21.87)	11 (2.06)	19 (3.55)
	No	190	26 (13.68)	0 (0)	5 (2.63)
Season	Autumn	371	67 (18.06)	6 (1.62)	16 (4.31)
	Spring	71	16 (22.54)	1 (1.41)	1 (1.41)
	Summer	178	37 (20.79)	2 (1.12)	5 (2.81)
	Winter	105	23 (21.90)	2 (1.09)	2 (1.09)
Size of herd	Big	395	77 (19.49)	6 (1.52)	6 (1.52)
	Medium	283	58 (20.49)	4 (1.41)	18 (6.36)
	Small	47	8 (17.02)	1 (2.13)	0 (0)
Type of housing	Stall	262	49 (18.70)	3 (1.15)	9 (3.44)
	Pasture	385	78 (20.26)	7 (1.82)	11 (2.86)
	Mix	78	16 (20.51)	1 (1.28)	4 (5.13)
Total		725	143	11	24

Note: Age class (young <5 years, adult 5–20 years and geriatric >20 years); body score according to Henneke scale (thin <4, moderate 4–7 and fat >7); size of herd (small <5 horses, medium 6–19 horses and big >20 horses).

training clinical veterinarians to better prevent, detect and alert on this disease, which would likely improve not only to mitigate its effect on the equine populations, but also on public health.

Despite the high seroprevalence observed, only 5.35% of the equids were vaccinated against WNV in the studied area. In EEUU, the introduction of a vaccine in 2002 resulted in a remarkable reduction in the subsequent number of equine encephalitis cases in 2003, in contrast to the large increase in human cases (Ng et al., 2003). Therefore, equine vaccination should be encouraged and carried out to reduce the risk of WNV infection in horses in western Spain.

It is noteworthy that 19 animals (3 of them doubtful) presented WNV ELISA-IgM antibodies, of which 12 were confirmed positive by VNT to WNV or undetermined flaviviruses. These samples (positive IgM ELISA + VNT) were taken between September and November 2018 ($N = 8$) and between September and October 2019 ($N = 3$). One additional WNV IgM-positive horse was sampled at the beginning of March 2019. The presence of high WNV IgM antibodies is the best serological indication for a recent infection, as in horses persistence of these antibodies is less than three months (Angenvoort et al., 2013; Castillo-Olivares et al., 2011). Therefore, our results confirm that there has been an active circulation of the virus among

TABLE 3 Results of the GLMM analysing the relationships between the characteristics of individual equids (gender, age, body score, breed, hair coat colour, aptitude, competition, hypersensitivity to insect bites), herd characteristics (type of housing, size of herd, presence of water) and season, and the seroprevalence of WNV infection (N = 725)

Variable	Category	Estimate ($\pm$ SE)	χ^2	df	p-value
Intercept	—	−0.98 (0.56)	3.06	1	.08
Gender	Females	0.00 ^a	0.08	1	.78
	Males	−0.06 (0.23)			
Age	Adults	0.00 ^a	8.13	2	.02
	Geriatrics	−0.05 (0.3)			
	Foals	−0.76 (0.27)			
Body score	Thin	0.00 ^a	1.87	2	.39
	Normal	−0.34 (0.39)			
	Fat	−0.63 (0.47)			
Breed	Crossbreed	0.00 ^a	0.19	2	.91
	Other equidae	−0.16 (0.63)			
	Purebred	−0.1 (0.26)			
Hair coat colour	Light	0.00 ^a	4.07	1	.04
	Dark	−0.41 (0.2)			
Aptitude	Leisure and sport	0.00 ^a	0.43	1	.51
	Reproduction	0.22 (0.33)			
Type of housing	Stall	0.00 ^a	0.72	2	.69
	Pasture	0.01 (0.3)			
	Mix	−0.32 (0.42)			
Competition	No	0.00 ^a	0.19	1	.66
	Yes	−0.15 (0.33)			
Presence of water	No	0.00 ^a	1.42	1	.23
	Yes	0.4 (0.34)			
Hypersensitivity to insect bites	No	0.00 ^a	0.03	1	.87
	Yes	−0.05 (0.32)			
Seize of herd	Big	0.00 ^a	0.80	2	.67
	Medium	0.03 (0.32)			
	Small	−0.42 (0.52)			
Season	Autumn	0.00 ^a	1.09	3	.78
	Spring	0.18 (0.47)			
	Summer	−0.26 (0.38)			
	Winter	0.17 (0.38)			

^aReference category.

horses in western Spain in the last 2 years (2018 and 2019). Possibly, the horse IgM-seropositive sampled in March 2019 had been probably infected in November–December 2018, confirming that year as one with the longest transmission season (European Centre for Disease Prevention & Control, 2019) or the WNV transmission could probably occur as early in the year, such as during the first three months of the year 2019.

The RT-PCR had identified WNV lineage 1 in the brain and cerebellum of a dead horse included in the study. Before the identification of WNV lineage 2 in Europe in 2004, all WNV outbreaks had been associated with lineage 1 (Bakonyi et al., 2006; Vilibic-Cavlek

et al., 2019). In fact, WNV lineage 1 has been detected previously in birds, horses and mosquitoes from Spain (Vázquez et al., 2011; Sotelo et al., 2012) and it is still predominant in wide areas of Spain where WNV circulation is present (Sánchez-Gómez et al., 2017). According to our results, it seems that lineage 1 is currently widespread in western Spain and the finding of WNV lineage 1 in an outbreak affecting 2 owlets in the same area of study further corroborates this situation (unpublished data). However, in 2018, lineage 2 was detected for the first time in Catalonia (north-eastern Spain) in two northern goshawk individuals by passive surveillance (Busquets et al., 2019) and an additional WNV lineage with

TABLE 4 Results of GLMM analysing the relationships between the characteristics of individual equids (gender, age, body score, breed, hair coat colour, aptitude, competition, hypersensitivity to insect bites), herd characteristics (type of housing, size of herd, number of equids, presence of water) and season, and the seroprevalence of USUV (N = 725)

Variable	Category	Estimate ($\pm$ SE)	χ^2	df	p-value
Intercept	—	−20.56 (162.93)	0.02	1	.89
Gender	Females	0.00 ^a	1.03	1	.31
	Males	−0.75 (0.73)			
Age	Adults	0.00 ^a	2.01	2	.36
	Geriatrics	−0.68 (1.12)			
	Foals	−1.48 (1.11)			
Body score	Thin	0.00 ^a	3.69	2	.16
	Normal	−17.54 (0.93)			
	Fat	−1.01 (1.02)			
Breed	Crossbreed	0.00 ^a	4.09	2	.13
	Other equidae	−17.55 (591.21)			
	Purebred	1.56 (0.77)			
Hair coat colour	Light	0.00 ^a	0.51	1	.47
	Dark	0.47 (0.66)			
Aptitude	Leisure and sport	0.00 ^a	0.76	1	.38
	Reproduction	−0.77 (0.89)			
Type of housing	Stall	0.00 ^a	0.38	2	.83
	Pasture	−0.36 (0.86)			
	Mix	−0.78 (1.3)			
Competition	No	0.00 ^a	0.46	1	.49
	Yes	−0.83 (1.22)			
Presence of water	No	0.00 ^a	0.01	1	.91
	Yes	18.8 (162.93)			
Hypersensitivity to insect bites	No	0.00 ^a	0.08	1	.77
	Yes	−0.32 (1.11)			
Seize of herd	Big	0.00 ^a	0.14	2	.93
	Medium	−0.29 (0.77)			
	Small	−0.07 (1.19)			
Season	Autumn	0.00 ^a	2.50	3	.47
	Spring	−0.63 (1.19)			
	Summer	−1.47 (0.94)			
	Winter	−0.23 (1.01)			

^aReference category.

a common evolutionary branch with lineage 4 was detected in mosquitoes in southern Spain (Vázquez et al., 2010). So, it will be important to keep WNV surveillance and to recognize the possible introduction of new lineages, such as lineage 2, associated with pathogenic potential in horses.

According to our results, there was a significant risk for WNV infection in horses associated with age, being adults (6–19 years) those with the highest probability of exposure compared to young animals (<5 years). Cardinale et al. (2017) found that the older horses (between 11 and 15 years old) had the higher percentage of WNV antibodies, and Hassine et al. (2014) also observed that risk

of WNV infection increased with the age of animals. In other studies, no significant differences among age classes were observed in horses (García-Bocanegra et al., 2012; Vanhomwegen et al., 2017). Assuming that anti-WNV IgG usually persists several years after infection, our results would suggest the presence of an endemic and recurrent circulation of WNV over the time in the studied areas.

Our study also showed significant higher seroprevalence in the light hair coat colour (N = 366; 22.95%) as compared to the dark colour (N = 359; 16.43%). There are few studies that analyse this variable with seroprevalence in equids. Our results are consistent with those of Aharonson-Raz et al. (2014) in horses from Israel, who

observed a significantly lower seroprevalence in the dark colour group (black/dark, brown/dark, grey) as compared to the light colour group (grey/light appaloosa), indicating an association between colour and breed. Also, Azmi et al. (2017) found a significant lower seroprevalence in coloured horses (Paint horses and Appaloosas) than solid-coloured horses, but no significant differentiation was found between light and dark horses regarding seroprevalence. Other study conducted by Epp, Waldner, West, and Townsend in (2007) analysed the factors associated with WNV disease fatalities in horses. They found that light-coloured horses had greater odds of dying from WNV clinical disease than did dark-coloured horses, possibly due to some genetic link between immune response and colour. Mosquitoes use a combination of visual, thermal and chemical cues emitted by vertebrate hosts to locate blood meals (Hawkes & Gibson, 2016; Lehane, 2005). In general, darker colours are more attractive to host-seeking mosquitoes than light colours (Allan, Day, & Edman, 1987). However, contrary to this assumption but similar to our results (Yan, Gangoso, Martínez-de la Puente, Soriguer, & Figuerola, 2017) found that birds with a greater percentage of slightly attractive colours, that is, light brown, light green, yellow and white, were preferred by *Cx. pipiens*. These authors mention that it is the contrast against the dark background what can make light colour attractive to mosquitoes. Mosquitoes are attracted by reflected white light in a greater percentage than by black light due to greater brightness and sharper colour under conditions of poor visibility (night) than in daytime (Browne & Bennett, 1981). Because *Cx. pipiens* usually peaks at sunrise, sunset or at night (Becker et al., 2010) the lighter colours of horses can favour their attraction to feed.

In the current study, there was no effect for gender on seropositivity, and this finding is similar to that of Durand et al. (2002) in France, Hassine et al. (2014) in Jordania or Bažanów et al. (2018) in horses from Poland. Other studies have reported a higher incidence of WNV in male horses than females (Ostlund et al., 2001; Tber, 1996). In the same sense, our results indicate that WNV seropositivity among equids is not significantly associated with seasons, body score, type of housing, aptitude, competition, presence of water and size of herd.

Eleven equids were seropositive for USUV by VNT. Because only WNV ELISA-positive/doubtful samples were tested for USUV, it is likely that the actual seroprevalence for this pathogen in our study could be underestimated. Although the competition ELISA kit used in this work (INgezim West Nile Compac, Ingenasa, Spain) can cross-react with other flaviviruses as the manufacturer admit in the accompanying information, this cross-reaction may not occur in all USUV-positive antibody samples, since different sera from USUV-infected partridges ($N = 8$) analysed by INgezim ELISA test gave negative results (Llorente et al., 2019). In any case, the use of USUV-specific serological methods would be expected to increase the accuracy of the estimation of seroprevalence for this pathogen. However, these methods are still not widely available for use in horses.

It seems that USUV was first introduced to Europe, particularly in Spain, in two different moments: in the 1950s and then in the 1990s,

along an eastern Atlantic migratory route (Engel et al., 2016). USUV has been detected previously in Spain in *Cx. pipiens* mosquitoes (Busquets et al., 2008) and in *Cx. perexiguus* (Vázquez et al., 2011). The USUV strains detected in *Cx. pipiens* mosquitoes in Spain were genetically more closely related to the African isolates than to central European ones (Bakonyi, Busquets, & Nowotny, 2014). This virus, or specific antibodies, had also been reported in birds from Spain (Ferraguti et al., 2016; Figuerola, Soriguer, Rojo, Tejedor, & Jimenez-Clavero, 2007; García-Bocanegra et al., 2011; Höfle et al., 2013; Jurado-Tarifa et al., 2016; Llorente et al., 2013). Phylogenetic comparisons of the Spanish strains indicated significant differences between USUVs of mosquito and bird origin (Höfle et al., 2013). USUV infection had also been confirmed in Spanish red deer (García-Bocanegra et al., 2016). Despite all this USUV information on mosquitoes, birds and mammals in Spain, there is very little information about USUV infections in horses. In Balearic Islands, Vanhomwegen et al. (2017) found a USUV seroprevalence of 1.2% in 172 Majorcan horses, similar to our results (1.52%). In Italy, studies in equids have shown higher percentages of USUV seroprevalences: between 89.2% in 2008 and 7.8% in 2009 (Savini et al., 2011). In the same way, a high seroprevalence of anti-USUV-neutralizing antibodies was found in horses in Poland (27.98%) (Bažanów et al., 2018). By contrast, other studies are coincident with our results, showing low seroprevalences for USUV in horses. In Slovakia, none of the tested horses were USUV-positive (Csank et al., 2018), and in Croatia, only 2 of 69 WNV ELISA-positive horses had USUV-neutralizing antibodies (Barbic et al., 2013). In the south of Tunisia, the analysis of 284 equids showed that 10 had USUV-neutralizing antibodies (Hassine et al., 2014). According to Savini et al. (2011), horses did not show a strong immune response against USUV. This species is not susceptible to the virus and does not induce high antibody titres (Hassine et al., 2014). In humans, USUV has been associated with cases of encephalitis indicating that it is also able to invade the central nervous system (Clé et al., 2019), such as other members of the Japanese encephalitis virus (JEV) complex. Our results show, for the first time, the presence of USUV in horses from western Spain, so it would be useful to implement early warning systems to detect USUV activity in order to assess the risk of its circulation for public health.

According to the statistical analysis, the pure breeds, specifically the warmblood breeds (Arabian and Thoroughbred), are more likely to present USUV antibodies. Few studies have addressed the influence of this factor in USUV horse infections. Some authors found differences between horse breeds and WNV infection (Ahmadnejad et al., 2011; Rios et al., 2009) but not with USUV infection (Bažanów et al., 2018). Ahmadnejad et al. (2011) also found that the Arab breed was a seropositive risk factor to WNV infection in horses of Iran and the quarter horses were four times more likely to be exposed to WNV than mixed breeds (Rios et al., 2009). In our case, the pure breeds, especially the Arabian breed and the Thoroughbred, seem to have a greater susceptibility to infection, possibly due to their training habits. These breeds are keeping outside, in pastures, where the concentration of vectors and birds is higher than in stalls. Also, these breeds

compete in endurance races consisting into run more than 40 kms in one day, which make them more exposed and more attractive (thermal and chemical cues) to possible vectors. The training is always outside with sessions of more than two hours of exercise in the vector feeding hours. This significant association was not observed in WNV infections, despite having a transmission cycle very similar to USUV. Therefore, considering this assumption and bearing in mind the low number of USUV-seropositive animals identified ($N = 11$), the final conclusions must be taken with caution. The differences between horse breeds and USUV infection could be also possible due to different genetic susceptibility to infection. In several mammalian species, like humans and mice, genes associated with the susceptibility to WNV infection have been reported (Bigham et al., 2011; Cahill, Conley, DeWan, & Montgomery, 2018; Mashimo et al., 2002). In horses, Rios et al. (2010) found associations concerned WNV-induced clinical disease. Concretely, they found six SNPs in the promoter region of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase 1 isoform (OAS1) associated with lethal WN meningoencephalitis. However, other researchers (Stejskalova et al., 2019) found that none of 138 SNPs in OAS1 was associated with lethal WN disease in two different equid breeds. So, it could be possible an individual variability in antiviral defence mechanisms, but the process seems to be complex and remains largely unclear today.

Further studies on a larger group of animals are needed to identify and confirm the risk factors of infection to reach more evidence-supported and robust conclusions.

5 | CONCLUSIONS

Our findings reflect the high WNV seroprevalence in equids from Extremadura and adjacent regions, the highest data found until now in equids from Spain. The presence of WNV-positive anti-IgM horses confirmed an active circulation of the virus among horses of western Spain in 2018 and 2019. The co-circulation of WNV and USUV is widespread in western Spain, including all the Extremadura region. Equine vaccination programmes should be encouraged to reduce the risk of WNV. It is also important to improve the surveillance programmes of public health to detect undiagnosed human cases in western Spain.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported financially by grant IB16135 funded by the Regional Ministry of Economy and Infrastructure, Extremadura Government and the European Regional Development Fund 'A way to make Europe' and grant E-RTA2015-00002-C02-00 funded by INIA. FG is supported by Ayudas a la Formación Investigador Predoctoral 2018 Formation contract (PD18056) from the Extremadura Government. PAS is funded by a FPI predoctoral fellowship from INIA. MF is currently funded by a Juan de la Cierva 2017 Formación contract (FJCI-2017-34394) from the Ministry of Science, Innovation and Universities. The authors would like to specially thank Margarita Rodríguez-Garau, María José Montero, Daniel

Jiménez-Vidal, J. Enrique Pérez-Martín, David Reina and Carmen Barbero for the laboratory analyses. This work would not be possible without the collaboration of numerous veterinary clinicians who agreed to participate in the study.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FG, DB-B and EF conceived the study. MÁJ-C and FL developed, designed and directed the analytical work at the laboratory; FG, DB-B, JMA, MM-C and EF collected samples and performed the experiments. FG, DB-B, PA-S and FL conducted the analyses. EF and MÁJ-C contributed to the reagents/materials/analysis tools. MF performed the statistical analyses. All authors read, contributed and approved the final version of the manuscript.

ETHICAL APPROVAL

The risk assessment was submitted to and approved by the ethics committee of the University of Extremadura (register no. 24/2017). To facilitate fieldwork, collaborations were established with veterinary clinicians and the samples were obtained during the routine clinical work.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Fátima Guerrero-Carvajal  <https://orcid.org/0000-0003-2267-7453>

orcid.org/0000-0003-2267-7453

Daniel Bravo-Barriga  <https://orcid.org/0000-0003-3481-7310>

María Martín-Cuervo  <https://orcid.org/0000-0002-4169-5318>

Pilar Aguilera-Sepúlveda  <https://orcid.org/0000-0002-2587-528X>

orcid.org/0000-0002-2587-528X

Martina Ferraguti  <https://orcid.org/0000-0001-7481-4355>

Miguel Ángel Jiménez-Clavero  <https://orcid.org/0000-0003-2125-9743>

orcid.org/0000-0003-2125-9743

Francisco Llorente  <https://orcid.org/0000-0003-1566-0266>

Juan Manuel Alonso  <https://orcid.org/0000-0002-1817-9227>

Eva Frontera  <https://orcid.org/0000-0003-0222-7850>

REFERENCES

- Abad-Cobo, A., Llorente, F., Barbero, M. D. C., Cruz-López, F., Forés, P., & Jiménez-Clavero, M. Á. (2017). Serosurvey reveals exposure to West Nile virus in asymptomatic horse populations in central Spain prior to recent disease foci. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(5), 1387–1392. <https://doi.org/10.1111/tbed.12510>
- Aberle, S. W., Kolodziejek, J., Jungbauer, C., Stiasny, K., Aberle, J. H., Zoufaly, A., ... Nowotny, N. (2018). Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. *Euro Surveillance*, 23(43), 1800545. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.43.1800545>
- Aharonson-Raz, K., Lichter-Peled, A., Tal, S., Gelman, B., Cohen, D., Klement, E., & Steinman, A. (2014). Spatial and temporal distribution of West Nile virus in horses in Israel (1997–2013)-from endemic to

- epidemics. *PLoS One*, 9(11), 113149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113149>
- Ahmadnejad, F., Otarod, V., Fallah, M. H., Lowenski, S., Sedighi-moghaddam, R., Zavareh, A., ... Sabatier, P. (2011). Spread of West Nile virus in Iran: A cross-sectional serosurvey in equines, 2008–2009. *Epidemiology and Infection*, 139(10), 1587–1593. <https://doi.org/10.1017/S0950268811000173>
- Allan, S. A., Day, J. F., & Edman, J. D. (1987). Visual ecology of biting flies. *Annual Review of Entomology*, 32(1), 297–314. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.32.010187.001501>
- Angenvoort, J., Brault, A. C., Bowen, R. A., & Groschup, M. H. (2013). West Nile viral infection of equids. *Veterinary Microbiology*, 167(1–2), 168–180. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.013>
- Azmi, K., Tirosh-Levy, S., Manasrah, M., Mizrahi, R., Nasereddin, A., Al-Jawabreh, A., ... Steinman, A. (2017). West Nile Virus: Seroprevalence in animals in Palestine and Israel. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(8), 558–566. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2090>
- Bakonyi, T., Busquets, N., & Nowotny, N. (2014). Comparison of complete genome sequences of Usutu virus strains detected in Spain, Central Europe and Africa. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14(5), 324–329. <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1510>
- Bakonyi, T., Ivanics, É., Erdélyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Weissenböck, H., & Nowotny, N. (2006). Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 12(4), 618–623. <https://doi.org/10.3201/eid1204.051379>
- Bakonyi, T., Jungbauer, C., Aberle, S. W., Kolodziejek, J., Dimmel, K., Stiasny, K., ... Nowotny, N. (2017). Usutu virus infections among blood donors, Austria, July and August 2017 – Raising awareness for diagnostic challenges. *Euro Surveillance*, 22(41), 17–00644. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.41.17-00644>
- Barbić, L., Listeš, E., Katić, S., Stevanović, V., Madić, J., Starešina, V., ... Savini, G. (2012). Spreading of West Nile virus infection in Croatia. *Veterinary Microbiology*, 159(3–4), 504–508. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.038>
- Barbic, L., Vilibic-Cavlek, T., Listes, E., Stevanovic, V., Gjenero-Margan, I., Ljubin-Sternak, S., ... Savini, G. (2013). Demonstration of Usutu Virus antibodies in horses. *Croatia. Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 13(10), 772–774. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1236>
- Barros, S. C., Ramos, F., Fagulha, T., Duarte, M., Henriques, M., Luís, T., & Fevereiro, M. (2011). Serological evidence of West Nile virus circulation in Portugal. *Veterinary Microbiology*, 152(3–4), 407–410. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.013>
- Bažanów, B., Jansen van Vuren, P., Szymański, P., Stygar, D., Frącka, A., Twardoń, J., ... Paweńska, J. (2018). A survey on West Nile and Usutu viruses in horses and birds in Poland. *Viruses*, 10(2), 87. <https://doi.org/10.3390/v10020087>
- Beck, C., Jimenez-Clavero, M., Leblond, A., Durand, B., Nowotny, N., Leparc-Goffart, I., ... Lecollinet, S. (2013). Flaviviruses in Europe: Complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(11), 6049–6083. <https://doi.org/10.3390/ijerph10116049>
- Becker, N., Petrić, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., & Kaiser, A. (2010). *Mosquitoes and their control* (2nd ed.). Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-92874-4>
- Ben Hassine, T., De Massis, F., Calistri, P., Savini, G., BelHaj Mohamed, B., Ranen, A., ... Hammami, S. (2014). First detection of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids in the south-west of Tunisia. *Transboundary and Emerging Diseases*, 61(5), 385–389. <https://doi.org/10.1111/tbed.12259>
- Benjelloun, A., El Harrak, M., Calistri, P., Loutfi, C., Kabbaj, H., Conte, A., ... Belkadi, B. (2017). Seroprevalence of West Nile virus in horses in different Moroccan regions. *Veterinary Medicine and Science*, 3(4), 198–207. <https://doi.org/10.1002/vms3.71>
- Bigham, A. W., Buckingham, K. J., Husain, S., Emond, M. J., Boffending, K. M., Gildersleeve, H., ... Bamshad, M. (2011). Host genetic risk factors for West Nile virus infection and disease progression. *PLoS One*, 6(9), e24745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024745>
- Browne, S. M., & Bennett, G. F. (1981). Response of mosquitoes to visual stimuli. *Journal of Medical Entomology*, 18(6), 505–521.
- Bunning, M. L., Bowen, R. A., Cropp, B. C., Sullivan, K. G., Davis, B. S., Komar, N., ... Mitchell, C. J. (2002). Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*, 8(4), 380–386. <https://doi.org/10.3201/eid0804.010239>
- Busquets, N., Alba, A., Allepuz, A., Aranda, C., & Núñez, J. I. (2008). Usutu virus sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 14(5), 861–863. <https://doi.org/10.3201/eid1405.071577>
- Busquets, N., Laranjo-González, M., Soler, M., Nicolás, O., Rivas, R., Talavera, S., ... Napp, S. (2019). Detection of West Nile virus lineage 2 in North-Eastern Spain (Catalonia). *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(2), 617–621. <https://doi.org/10.1111/tbed.13086>
- Cahill, M. E., Conley, S., DeWan, A. T., & Montgomery, R. R. (2018). Identification of genetic variants associated with dengue or West Nile virus disease: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 18(1), 282. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3186-6>
- Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, R. E., Porterfield, J. S., Westaway, E. G., & Brandt, W. E. (1989). Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *Journal of General Virology*, 70(1), 37–43. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-1-37>
- Cardinale, E., Bernard, C., Lecollinet, S., Rakotoharinome, V. M., Ravaomanana, J., Roger, M., ... Cêtre-Sossah, C. (2017). West Nile virus infection in horses, Indian Ocean. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 53, 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.06.006>
- Castillo-Olivares, J., Mansfield, K. L., Phipps, L. P., Johnson, N., Tearle, J., & Fooks, A. R. (2011). Antibody response in horses following experimental infection with West Nile virus lineages 1 and 2. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(3), 206–212. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01197.x>
- Christova, I., Papa, A., Trifonova, I., Panayotova, E., Pappa, S., & Mikov, O. (2020). West Nile virus lineage 2 in humans and mosquitoes in Bulgaria, 2018–2019. *Journal of Clinical Virology*, 127, 104365. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104365>
- Clé, M., Beck, C., Salinas, S., Lecollinet, S., Gutierrez, S., Van de Perre, P., ... Simonin, Y. (2019). Usutu virus: A new threat? *Epidemiology and Infection*, 147, e232. <https://doi.org/10.1017/S0950268819001213>
- Csank, T., Drzewnioková, P., Korytár, L., Major, P., Gyuranecz, M., Pistl, J., & Bakonyi, T. (2018). A serosurvey of flavivirus infection in horses and birds in Slovakia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 18(4), 206–213. <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2216>
- Del Amo, J., Sotelo, E., Fernández-Pinero, J., Gallardo, C., Llorente, F., Agüero, M., & Jiménez-Clavero, M. A. (2013). A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus. *Journal of Virological Methods*, 189(2), 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.02.019>
- Durand, B., Chevalier, V., Pouillot, R., Labie, J., Marendat, I., Murgue, B., ... Zientara, S. (2002). West Nile virus outbreak in horses, Southern France, 2000: Results of a serosurvey. *Emerging Infectious Diseases*, 8(8), 777–782. <https://doi.org/10.3201/eid0808.010486>
- Engel, D., Jöst, H., Wink, M., Börstler, J., Bosch, S., Garigliany, M.-M., ... Schmidt-Chanasit, J. (2016). Reconstruction of the evolutionary history and dispersal of Usutu virus, a neglected emerging arbovirus in Europe and Africa. *MBio*, 7(1), e01938–e2015. <https://doi.org/10.1128/mBio.01938-15>
- Epp, T., Waldner, C., West, K., & Townsend, H. (2007). Factors associated with West Nile virus disease fatalities in horses. *Canadian Veterinary Journal*, 48(11), 1137–1145.

- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2019). West Nile virus infection. In ECDC. *Annual epidemiological report for 2018*. Stockholm, Sweden. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-infection-annual-epidemiological-report-2018#no-link>
- Ferraguti, M., De la Puente, J. M., Soriguer, R., Llorente, F., Jiménez-Clavero, M. A., & Figuerola, J. (2016). West Nile virus-neutralizing antibodies in wild birds from southern Spain. *Epidemiology and Infection*, 144(9), 1907–1911. <https://doi.org/10.1017/S0950268816000133>
- Figuerola, J., Soriguer, R., Rojo, G., Tejedor, C. G., & Jimenez-Clavero, M. A. (2007). Seroconversion in wild birds and local circulation of West Nile virus, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 13(12), 1915–1917. <https://doi.org/10.3201/eid1312.070343>
- Gangoso, L., Aragonés, D., Martínez-de la Puente, J., Lucientes, J., Delacour-Estrella, S., Estrada Peña, R., ... Figuerola, J. (2020). Determinants of the current and future distribution of the West Nile virus mosquito vector *Culex pipiens* in Spain. *Environmental Research*, 188, 109837. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109837>
- García-Bocanegra, I., Belkhiria, J., Napp, S., Cano-Terriza, D., Jiménez-Ruiz, S., & Martínez-López, B. (2018). Epidemiology and spatio-temporal analysis of West Nile virus in horses in Spain between 2010 and 2016. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(2), 567–577. <https://doi.org/10.1111/tbed.12742>
- García-Bocanegra, I., Busquets, N., Napp, S., Alba, A., Zorrilla, I., Villalba, R., & Arenas, A. (2011). Serosurvey of West Nile virus and other flaviviruses of the Japanese encephalitis antigenic complex in birds from Andalusia, southern Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(8), 1107–1113. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0237>
- García-Bocanegra, I., Jaén-Téllez, J. A., Napp, S., Arenas-Montes, A., Fernández-Morente, M., Fernández-Molera, V., & Arenas, A. (2012). Monitoring of the West Nile virus epidemic in Spain between 2010 and 2011. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(5), 448–455. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01298.x>
- García-Bocanegra, I., Paniagua, J., Gutiérrez-Guzmán, A. V., Lecollinet, S., Boadella, M., Arenas-Montes, A., ... Höfle, U. (2016). Spatio-temporal trends and risk factors affecting West Nile virus and related flavivirus exposure in Spanish wild ruminants. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 249. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0876-4>
- Hawkes, F., & Gibson, G. (2016). Seeing is believing: The nocturnal malarial mosquito *Anopheles coluzzii* responds to visual host-cues when odour indicates a host is nearby. *Parasites and Vectors*, 9(1), 320. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1609-z>
- Hernández-Triana, L. M., Jeffries, C. L., Mansfield, K. L., Carnell, G., Fooks, A. R., & Johnson, N. (2014). Emergence of West Nile virus lineage 2 in Europe: A review on the introduction and spread of a mosquito-borne disease. *Frontiers in Public Health*, 2, 271. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00271>
- Heus, P., Kolodziejek, J., Camp, J. V., Dimmel, K., Bagó, Z., Hubálek, Z., ... Nowotny, N. (2019). Emergence of West Nile virus lineage 2 in Europe: Characteristics of the first seven cases of West Nile neuroinvasive disease in horses in Austria. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(3), 1189–1197. <https://doi.org/10.1111/tbed.13452>
- Höfle, U., Gamino, V., de Mera, I. G. F., Mangold, A. J., Ortiz, J.-A., & de la Fuente, J. (2013). Usutu virus in migratory song thrushes, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 19(7), 1173–1175. <https://doi.org/10.3201/eid1907.130199>
- Jiménez-Clavero, M. A., Llorente, F., Sotelo, E., Soriguer, R., Gómez-Tejedor, C., & Figuerola, J. (2010). West Nile virus serosurveillance in horses in Doñana, Spain, 2005 to 2008. *Veterinary Record*, 167(10), 379–380. <https://doi.org/10.1136/vr.c3155>
- Jiménez-Clavero, M. A., Tejedor, C. G., Rojo, G., Soriguer, R., & Figuerola, J. (2007). Serosurvey of West Nile virus in equids and bovines in Spain. *Veterinary Record*, 161(6), 212. <https://doi.org/10.1136/vr.161.6.212>
- Jurado-Tarifa, E., Napp, S., Lecollinet, S., Arenas, A., Beck, C., Cerdà-Cuellar, M., ... García-Bocanegra, I. (2016). Monitoring of West Nile virus, Usutu virus and Meaban virus in waterfowl used as decoys and wild raptors in southern Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 49, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.10.001>
- Kaptoul, D., Viladrich, P. F., Domingo, C., Niubó, J., Martínez-Yélamos, S., De Ory, F., & Tenorio, A. (2007). West Nile virus in Spain: Report of the first diagnosed case (in Spain) in a human with aseptic meningitis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 39(1), 70–71. <https://doi.org/10.1080/00365540600740553>
- Lafri, I., Prat, C. M., Bitam, I., Gravier, P., Besbaci, M., Zeroual, F., ... Leparc-Goffart, I. (2017). Seroprevalence of West Nile virus antibodies in equids in the North-East of Algeria and detection of virus circulation in 2014. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 50, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.11.005>
- Lehane, M. J. (2005). *Biology blood sucking insects*. (2nd ed.). In *Entomology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Llorente, F., García-Irazábal, A., Pérez-Ramírez, E., Cano-Gómez, C., Sarasa, M., Vázquez, A., & Jiménez-Clavero, M. Á. (2019). Influence of flavivirus co-circulation in serological diagnostics and surveillance: A model of study using West Nile, Usutu and Bagaza viruses. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(5), 2100–2106. <https://doi.org/10.1111/tbed.13262>
- Llorente, F., Pérez-Ramírez, E., Fernández-Pinero, J., Soriguer, R. C., Figuerola, J., & Jiménez-Clavero, M. Á. (2013). Flaviviruses in game birds. *Emerging Infectious Diseases*, 19(6), 1023–1025. <https://doi.org/10.3201/eid1906.130122>
- Martinet, J. P., Ferté, H., Failloux, A. B., Schaffner, F., & Depaquit, J. (2019). Mosquitoes of north-western Europe as potential vectors of arboviruses: A review. *Viruses*, 11(11), 1059. <https://doi.org/10.3390/v11111059>
- Mashimo, T., Lucas, M., Simon-Chazottes, D., Frenkiel, M.-P., Montagutelli, X., Ceccaldi, P.-E., ... Despres, P. (2002). A nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11311–11316. <https://doi.org/10.1073/pnas.172195399>
- Ministerio de Agricultura, P. y A. (2019). El sector equino en cifras. Principales indicadores económicos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Retrieved from <http://publicacionesoficiales.boe.es/NIPO:003191624>
- Mixão, V., Bravo Barriga, D., Parreira, R., Novo, M. T., Sousa, C. A., Frontera, E., ... Almeida, A. P. G. (2016). Comparative morphological and molecular analysis confirms the presence of the West Nile virus mosquito vector, *Culex univittatus*, in the Iberian Peninsula. *Parasites and Vectors*, 9(1), 601. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1877-7>
- Moreno, J., Tenorio, A., Figuerola, J., Sánchez-Seco, M. P., Ruiz, S., Vázquez, A., ... Herrero, L. (2011). West Nile and Usutu viruses in mosquitoes in Spain, 2008–2009. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(1), 178–181. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0042>
- Ng, T., Hathaway, D., Jennings, N., Champ, D., Chiang, Y. W., & Chu, H. J. (2003). Equine vaccine for West Nile virus. *Journal of Developmental Biology*, 114, 221–227.
- Ostlund, E. N., Crom, R. L., Pedersen, D. D., Johnson, D. J., Williams, W. O., & Schmitt, B. J. (2001). Equine West Nile encephalitis, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 7(4), 665–669. <https://doi.org/10.3201/eid0704.017412>
- Pérez-Ramírez, E., Llorente, F., del Amo, J., Fall, G., Sall, A. A., Lubisi, A., ... Jiménez-Clavero, M. Á. (2017). Pathogenicity evaluation of twelve West Nile virus strains belonging to four lineages from five continents in a mouse model: Discrimination between three pathogenicity categories. *Journal of General Virology*, 98(4), 662–670. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000743>
- Petersen, L. R., Brault, A. C., & Nasci, R. S. (2013). West Nile virus: Review of the literature. *Journal of the American Medical Association*, 310(3), 308–315. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.8042>

- Ravagnan, S., Montarsi, F., Cazzin, S., Porcellato, E., Russo, F., Palei, M., ... Capelli, G. (2015). First report outside Eastern Europe of West Nile virus lineage 2 related to the Volgograd 2007 strain, northeastern Italy, 2014. *Parasites and Vectors*, 8(1), 418. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1031-y>
- Rios, J. J., Fleming, J. A. G. W., Bryant, U. K., Carter, C. N., Huber, J. C., Long, M. T., ... Adelson, D. L. (2010). OAS1 polymorphisms are associated with susceptibility to West Nile encephalitis in horses. *PLoS One*, 5(5), e10537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010537>
- Rios, L. M. V., Sheu, J.-J., Day, J. F., Maruniak, J. E., Seino, K., Zaretsky, H., & Long, M. T. (2009). Environmental risk factors associated with West Nile virus clinical disease in Florida horses. *Medical and Veterinary Entomology*, 23(4), 357–366. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2009.00821.x>
- Rizzoli, A., Jiménez-Clavero, M., Barzon, L., Cordioli, P., Figuerola, J., Koraka, P., ... Tenorio, A. (2015). The challenge of West Nile virus in Europe: Knowledge gaps and research priorities. *Euro Surveillance*, 20(20), 21135. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2015.20.20.21135>
- Rodríguez, G. (2010). *Models for over-dispersed count data Generalized Linear Models*. Princeton University. Retrieved from <http://data.princeton.edu/wws509/stata/overdispersion.html>
- Roiz, D., Vázquez, A., Ruiz, S., Tenorio, A., Soriguer, R., & Figuerola, J. (2019). Evidence that Passerine birds act as amplifying hosts for Usutu virus circulation. *EcoHealth*, 16(4), 734–742. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01441-3>
- Sánchez-Gómez, A., Amela, C., Fernández-Carrión, E., Martínez-Avilés, M., Sánchez-Vizcaíno, J. M., & Sierra-Moros, M. J. (2017). Risk mapping of West Nile virus circulation in Spain, 2015. *Acta Tropica*, 169, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.022>
- Savini, G., Capelli, G., Monaco, F., Polci, A., Russo, F., Di Gennaro, A., ... Lelli, R. (2012). Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy. *Veterinary Microbiology*, 158(3–4), 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.018>
- Savini, G., Monaco, F., Terregino, C., Di Gennaro, A., Bano, L., Pinoni, C., ... Lelli, R. (2011). Usutu virus in Italy: An emergence or a silent infection? *Veterinary Microbiology*, 151(3–4), 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.036>
- Sotelo, E., Fernández-Pinero, J., & Jiménez-Clavero, M. Á. (2012). La fiebre/encefalitis por virus West Nile: Reemergencia en Europa y situación en España. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(2), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.002>
- Stejskalova, K., Cvanova, M., Oppelt, J., Janova, E., Horecky, C., Horecka, E., ... Horin, P. (2019). Genetic susceptibility to West Nile virus infection in Camargue horses. *Research in Veterinary Science*, 124, 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.04.004>
- Tber, A. A. (1996). West Nile fever in horses in Morocco. *Bulletin De L'office International Des Epizooties*, 11, 867–869.
- Vanhomwegen, J., Beck, C., Desprès, P., Figuerola, A., García, R., Lecollinet, S., ... Serra-Cobo, J. (2017). Circulation of zoonotic arboviruses in equine populations of Mallorca Island (Spain). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(5), 340–346. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2042>
- Vázquez, A., Sánchez-Seco, M. P., Ruiz, S., Molero, F., Hernández, L., Moreno, J., ... Tenorio, A. (2010). Putative new lineage of West Nile virus, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 16(3), 549–552. <https://doi.org/10.3201/eid1603.091033>
- Vilibic-Cavlek, T., Savic, V., Petrovic, T., Toplak, I., Barbic, L., Petric, D., ... Savini, G. (2019). Emerging trends in the epidemiology of West Nile and Usutu Virus infections in southern Europe. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 437. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00437>
- Weissenböck, H., Kolodziejek, J., Url, A., Lussy, H., Rebel-Bauder, B., & Nowotny, N. (2002). Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne Flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 8(7), 652–656. <https://doi.org/10.3201/eid0807.020094>
- Yan, J., Gangoso, L., Martínez-de la Puente, J., Soriguer, R., & Figuerola, J. (2017). Avian phenotypic traits related to feeding preferences in two *Culex* mosquitoes. *Science of Nature*, 104(9–10), 76. <https://doi.org/10.1007/s00114-017-1497-x>
- Zeller, H. G., & Schuffenecker, I. (2004). West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(3), 147–156. <https://doi.org/10.1007/s10096-003-1085-1>
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., & Elphick, C. S. (2010). A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*, 1(1), 3–14. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210x.2009.00001.x>

How to cite this article: Guerrero-Carvajal F, Bravo-Barriga D, Martín-Cuervo M, et al. Serological evidence of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids from western Spain. *Transbound Emerg Dis*. 2021;68:1432–1444. <https://doi.org/10.1111/tbed.13810>

6.1.2. West Nile and Usutu virus infections in wild birds admitted to rehabilitation centres in Extremadura Western Spain, 2017-2019

Daniel Bravo-Barriga¹, Pilar aguilera-Sepúlveda², **Fátima Guerrero-Carvajal^{1*}**, Francisco Llorente², David Reina¹, J. Enrique Pérez-Martín¹, Miguel Ángel Jiménez-Clavero^{2,3}, Eva Frontera¹.

¹Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura (Uex), Cáceres, España

²Centro de Investigación de Sanidad Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA-CISA), Valdeolmos, Madrid, España

³ Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, España

*** Fátima Guerrero Carvajal** actuó como autor de correspondencia de este artículo

Veterinary Microbiology 2021 255:109020

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109020>

Factor de impacto, cuartil y categoría: 3.246/Q1/VETERINARY SCIENCES

Posición categoría: 15/145

Artículo publicado online con acceso restringido pero que se cuenta con la aprobación de la revista para poder publicarlo en los resultados de la presente tesis doctoral (ANEXOS, 129).

Resumen

El VNO es un flavivirus emergente transmitido generalmente por mosquitos del género *Culex* spp. Se mantiene en un ciclo de vida endémico donde las aves actúan como hospedadores y reservorio principal del virus. Los seres humanos y los équidos son susceptibles de infectarse también, y ocasionalmente, pueden sufrir cuadros neurológicos que varían desde un cuadro asintomático hasta producir un cuadro neurológico grave que puede acabar en la muerte. Sin embargo, al contrario que las aves, ellos no pueden transmitir el virus a otros vectores, ya que la viremia en estos hospedadores accidentales es corta y la titulación de anticuerpos que pueden alcanzar también es baja, por lo que actúan como fondos de saco epidemiológico. Los casos esporádicos de VNO registrados en caballos y aves salvajes en Extremadura durante la temporada de los años 2016 y 2017 motivaron el inicio de este estudio de seroprevalencia en aves salvajes, centrado en aquellos animales que llegaban a diferentes centros de recuperación de la región extremeña.

El estudio se desarrolló entre octubre de 2017 a diciembre de 2019, recabando 391 muestras de aves silvestres de 56 especies diferentes que llegaron a dos Centros de Fauna Salvaje: “Los Hornos” y “AMUS” (Asociación Centro de Acción por el Mundo Salvaje), en las provincias de Cáceres y Badajoz, respectivamente. Se tomaron 2 ml de sangre de la vena yugular o de la braquial, dependiendo de la especie. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1000 g durante 10 min a 4 °C dentro de las siguientes 24 h después de la recolección, para separar el suero, que se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis. El análisis de los sueros se llevó a cabo mediante pruebas ELISA (kit INGEZIM West Nile COMPAC, Ingenasa, España) para detectar la presencia de anticuerpos específicos frente al VNO, los cuales fueron confirmados posteriormente mediante micro-VNT contra el VNO (cepa VNO E101, GenBank nº de acceso AF260968), el VUSU (cepa VUSU SAAR-1776, GenBank nº de acceso AY453412) y VBAG (VBAG GenBank, nº de acceso KR108244). Además, en las aves con sintomatología nerviosa se tomaron muestras de diferentes órganos y tejidos para intentar aislar ARN viral y detectar el linaje del VNO implicado mediante una dúplex RT-PCR.

Los resultados evidenciaron que el 18,23% de las aves fueron seropositivas, pertenecientes a 18 especies diferentes. Entre las aves con mayor seroprevalencia, destacaron las del orden Pelecaniformes, con el 33,33%, Accipitriformes, con el 25,77% y Strigiformes, con el 22,92%. Por primera vez en Europa se detectan anticuerpos anti-VNO en una cigüeña (*Ciconia ciconia*). El análisis de la dúplex RT-PCR en tiempo real en aves sintomáticas confirmó el linaje 1 del VNO en un buitre leonado y en 2 mochuelos europeos. Mediante la VNT y siempre que se dispuso de muestra suficiente, los sueros positivos y dudosos al ELISA específico para el VNO también fueron testados para otros flavivirus, como el VUSU y el VBAG, ya que se han descrito reacciones cruzadas mediante ELISA entre estos patógenos y el VNO. Se confirmó la seropositividad de cuatro muestras

al VUSU (el 1,04%), correspondientes a tres especies; un búho real (*Bubo bubo*), un buitre leonado (*Gyps fulvus*) y una avutarda (*Otis tarda*), siendo en esta última la primera detección en Europa. Ninguno de los sueros fue positivo para el VBAG. Lamentablemente no fue posible determinar el flavivirus específico mediante VNT en 16 muestras, el 4,17%. Este es el primer estudio que se ha llevado a cabo en aves silvestres en Extremadura, gracias al cual se ha podido confirmar una alta prevalencia del VNO en aves, así como su co-circulación con el VUSU en esta región geográfica. Además, la detección de este virus en 19 especies diferentes, algunas de ellas consideradas especies amenazadas o en peligro de extinción, pone de manifiesto las implicaciones ecológicas y la amenaza para la biodiversidad de estas poblaciones que pueden representar estos flavivirus en la actualidad. Debido al importante papel que juegan las aves en la transmisión del VNO, estos hallazgos revelan que los programas de vigilancia y control establecidos para este flavivirus deberían ser reforzados para minimizar los efectos que estos pueden tener sobre los seres humanos y los équidos.



West Nile and Usutu virus infections in wild birds admitted to rehabilitation centres in Extremadura, western Spain, 2017–2019

Daniel Bravo-Barriga^a, Pilar Aguilera-Sepúlveda^b, Fátima Guerrero-Carvajal^{a,*}, Francisco Llorente^b, David Reina^a, J. Enrique Pérez-Martín^a, Miguel Ángel Jiménez-Clavero^{b,c}, Eva Frontera^a

^a Animal Health Department, Veterinary Faculty, University of Extremadura (UEx), Cáceres, Spain

^b Animal Health Research Centre, National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA-CISA), Valdeolmos, Madrid, Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Extremadura
Seroprevalence
Spain
Usutu virus
West Nile virus
Wild birds

ABSTRACT

West Nile virus (WNV) is an emerging flavivirus transmitted generally by mosquitoes of *Culex* genus. It is maintained in an enzootic life cycle where birds act as reservoir hosts. Humans and horses are also susceptible to infection, and occasionally, they suffer from neurological complications. However, they do not transmit the virus to other vectors, behaving as dead-end hosts. Sporadic WNV outbreaks observed in horses and wild birds from Extremadura (western Spain) during 2016 and 2017 seasons prompted to carry out this survey in wild birds, focused on specimens coming from two wildlife rehabilitation centres. Between October 2017 and December 2019, samples from 391 wild birds, belonging to 56 different species were collected and analysed in search of evidence of WNV infection. The analysis of serum samples for WNV-specific antibodies by ELISA, whose specificity was subsequently confirmed by virus-neutralisation test (VNT) showed positive results in 18.23 % birds belonging to 18 different species. Pelecaniformes (33.33 %), Accipitriformes (25.77 %) and Strigiformes (22.92 %) orders had the higher seroprevalences. Remarkably, WNV-specific antibodies were found in a black stork for the first time in Europe. Analysis by real time RT-PCR in symptomatic birds confirmed the presence of WNV lineage 1 RNA in griffon vulture and little owls. Specificity analysis of ELISA positive and doubtful sera was performed by differential VNT titration against WNV and two other cross-reacting avian flaviviruses found in Spain: Usutu virus (USUV) and Bagaza virus (BAGV). Only four samples showed USUV-specific antibodies (1.04 %) corresponding to three species: Eurasian eagle-owl, griffon vulture and great bustard (first detection in Europe) whereas no samples were found reactive to BAGV. Differential VNT yielded undetermined flavivirus result in 16 samples (4.17 %). This is the first study carried out on wild birds from Extremadura (western Spain). It highlights the widespread circulation of WNV in the region and its co-circulation with USUV.

1. Introduction

Flaviviruses (genus flavivirus, family *Flaviviridae*) are an important taxonomic group of arthropod-borne RNA viruses, some of whose members are emerging and re-emerging pathogens. The epidemiology of some of these epornitic mosquito-borne viruses, such as West Nile virus (WNV) and Usutu virus (USUV), has dramatically changed in Europe in the last two decades (Vilibic-Cavlek et al., 2019a; Benzarti et al., 2019).

West Nile virus is a zoonotic flavivirus which has become one of the most widespread arboviruses in the world (Kramer et al., 2008). In

natural conditions it circulates between birds and ornithophilic mosquitoes, mainly of the *Culex* genus (Vogels et al., 2017), and mammals (mainly horses and humans) are considered dead-end hosts (Chancey et al., 2015). Birds frequently suffer from subclinical infection or do not develop severe clinical symptoms. Nevertheless, some species of raptors, jays and crows, are highly susceptible and can develop severe or fatal encephalitis (Gamino and Höfle, 2013). WNV was first described in Uganda in 1937 (Smithburn et al., 1940). Until the 90 s, some sporadic human outbreaks had been reported in Israel, Australia, Middle East and Africa (Murgue et al., 2001). However, between 1994 and

* Corresponding author at: University of Extremadura, Spain.

E-mail addresses: fgcarvajal@unex.es (D. Bravo-Barriga), aguilera.pilar@inia.es (P. Aguilera-Sepúlveda), fgcarvajal@unex.es (F. Guerrero-Carvajal), dgracia@inia.es (F. Llorente), dreina@unex.es (D. Reina), jeperez@unex.es (J.E. Pérez-Martín), majimenez@inia.es (M.Á. Jiménez-Clavero), frontera@unex.es (E. Frontera).

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109020>

Received 8 January 2021; Accepted 22 February 2021

Available online 24 February 2021

0378-1135/© 2021 Published by Elsevier B.V.

1999, serious outbreaks in humans or horses were observed in Algeria, Morocco, Tunisia, Italy, France, Romania, Israel, and Russia (Rossi et al., 2010). In 1999, WNV emerged in New York and rapidly spread across North America, where it caused substantial mortality in humans and corvids (Petersen, 2019). In the early years of the 21st century, the virus increased its expansion in countries such as Italy, Hungary, Romania, Austria, Croatia, Cyprus and Spain (Barrett, 2018). The largest human outbreak in Europe occurred in 2018, when 2083 infections and 180 deaths, as well as numerous equid cases, were reported (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2018).

Nine phylogenetic WNV lineages have been proposed (Rizzoli et al., 2015), but only lineages 1 and 2 are associated with disease in humans (Papa et al., 2011). In Europe, before the emergence of lineage 2 in 2004 (Bakonyi et al., 2006), lineage 1 provoked sporadic cases and occasional outbreaks in animals and humans. In 2004, lineage 2 was expanded from Hungary to eastern Austria and southern European countries. It was also simultaneously detected in Russia, extending toward Romania (Rizzoli et al., 2015). Since 2008, lineage 2 has caused more outbreaks in humans and animals than lineage 1 in Europe (Chaintoutis et al., 2019).

In Spain, since WNV lineage 1 was first detected in a man in 2004 (Kaptoul et al., 2007), other human cases have been detected (Bernabeu-Wittel et al., 2007; García-Bocanegra et al., 2011a; López-Ruiz et al., 2018). In the 2020 transmission season, 77 human cases (71 in Andalusia and 5 in Extremadura) and 8 deaths have been reported in Spain (García-San Miguel et al., 2020). WNV has also been detected in birds (López et al., 2008; Llorente et al., 2013; Ferraguti et al., 2016), mosquitoes (Vázquez et al., 2010, 2011), equids (Jiménez-Clavero et al., 2010; García-Bocanegra et al., 2011a, 2012, 2018a; Abad-Cobo et al., 2017; Guerrero-Carvajal et al., 2020), other mammals (Gutiérrez-Guzmán et al., 2012; García-Bocanegra et al., 2016, 2018b) and different zoo animals (Caballero-Gómez et al., 2020). Therefore, WNV is considered endemic, mainly in the south of the country, due to the favourable conditions for the maintenance and circulation of the virus (Sánchez-Gómez et al., 2017). Although WNV lineage 1 is the most frequent in Spain so far (Sánchez-Gómez et al., 2017; Guerrero-Carvajal et al., 2020), lineage 2 has also been detected in goshawks (*Accipiter gentilis*) in Catalonia (2 birds detected in 2017 and 3 in 2020 (Busquets et al., 2019; García-San Miguel et al., 2020)).

Usutu virus belongs to the Japanese encephalitis serocomplex. It was first detected in *Culex neavei* mosquitoes in 1959 in South Africa (Woodall, 1964). Some retrospective studies indicate a possible circulation in Europe since 1996 (Weissenböck et al., 2013). In 2001, it was detected as causative agent of a mass mortality event of Eurasian blackbirds (*Turdus merula*), barn swallows (*Hirundo rustica*) and grey owls (*Strix nebulosa*) in Austria (Weissenböck et al., 2002). Since then, this virus has rapidly spread throughout Europe and the Mediterranean basin, where outbreaks are marked by mass die-offs of wild birds. USUV has also been detected in mosquitoes and mammals such as horses, bats, dogs, wild boars, wild ruminants and humans (Cheng et al., 2018; Roesch et al., 2019; Clé et al., 2019). In humans, it has been identified as the aetiological agent of neuroinvasive disease in some instances (Aberle et al., 2018; Carletti et al., 2019; Nagy et al., 2019), evidencing its zoonotic potential and its importance for Public Health. In Spain, USUV has been shown to circulate by RNA detection in *Cx. pipiens* mosquitoes in Catalanian wetlands (Busquets et al., 2008) and in *Cx. perexiguus* (Vázquez et al., 2011) as well as in two live song thrushes (*Turdus philomelos*) in southern Spain in 2012 (Höfle et al., 2013). USUV and/or the specific antibodies have also been reported in equids (Vanhomwegen et al., 2017; Guerrero-Carvajal et al., 2020), red deers (García-Bocanegra et al., 2016) and birds from Spain (Figuerola et al., 2007; Höfle et al., 2013; Llorente et al., 2013; Ferraguti et al., 2016; Jurado-Tarifa et al., 2016).

Bagaza virus (BAGV), also known as Israel turkey meningoencephalomyelitis virus (ITV) (Fernández-Pinero et al., 2014), was isolated for the first time in 1966 in the Central African Republic in a *Culex* spp. pool (Digoutte, 1978). Until 2009, it was restricted to Africa, Israel and

India (Bondre et al., 2009; Fernández-Pinero et al., 2014; Benzarti et al., 2019). However, it was first detected in Europe in 2010, causing outbreaks in game birds in southern Spain (Agüero et al., 2011; García-Bocanegra et al., 2013; Llorente et al., 2013).

Extremadura is the Spanish region with the largest freshwater reserve of the country, with important wetlands as nesting areas for a high number and variety of birds. In addition, the strategic location of Extremadura with regard to the passage of migratory birds between Europe and Africa can play an important role in the transmission of various zoonotic pathogens (López et al., 2008). WNV outbreaks in horses have been reported in this area in recent years (MAPAMA, 2020) and the presence of antibodies in dogs and horses has been verified (García-Bocanegra et al., 2018b; Guerrero-Carvajal et al., 2020) but hitherto there is no information in birds. Thus, the aim of this study was to assess, for first time, the presence and distribution of WNV in wild birds from Extremadura arriving at rehabilitation centres. A possible co-circulation with other flaviviruses (USUV and BAGV) was also analysed.

2. Materials and methods

2.1. Study region

The study was conducted in Extremadura (39°12'N 6°09'W), a region in western Spain bordering with Portugal. This region has a Mediterranean climate catalogued as Csa (hot dry-summer) according to the Köppen climate classification (Beck et al., 2018). Most of the territory has an elevation between 200–600 m a.s.l. The average annual rainfall is 605 mm (400–1500 mm). In winter, average temperatures remain slightly below 7.5 °C and in summer the average temperature is 26 °C (reaching daytime highs exceeding 41 °C). Extremadura has a low human density (26 inhabitants/km²) and its total area covers 8.25 % of the Spanish territory (41,635 km²). About 74.1 % of the area is classified as “Important Bird Areas” (IBAs) (<http://www.keybiodiversityareas.org>) with up to 337 bird species (146 wintering bird species) (Mayor-domo et al., 2015).

2.2. Ethical statement

Samples tested in this study were obtained from wild birds admitted to two wildlife rehabilitation centres (WRC) during routine clinic work (medical check-ups or surgical interventions) by official veterinarians. Handling procedures were implemented according to European (86/609) and Spanish laws (R.D. 223/1988, R.D.1021/2005) and were aimed at reducing stress and minimize suffering from subjects.

2.3. Sampling procedure

From October 2017 to December 2019, 391 wild birds belonging to 56 different species were sampled in collaboration with two WRC in Extremadura: “Los Hornos” and “AMUS” (Centre for the Action for the Wild World Association), in Cáceres and Badajoz provinces, respectively. A total of 384 blood samples were analysed for WNV seroprevalence. Blood samples were collected using 2 mL syringes with 25 G needles or capillary tubes from the brachial or jugular veins depending on the species. Samples were obtained within the first 4 days after admission, once the bird was stabilized. The volume of blood collected never exceeded 1% of the bird's body mass (McGuill and Rowan, 1989) and it was deposited in a vial without anticoagulant and refrigerated between 4–8 °C for at least 2 h until processed. Blood was centrifuged at 1000 x g for 10 min at 4 °C and the obtained serum was stored at –20 °C until further analysis.

Blood and/or organ samples (brain, heart, intestine, liver, lung, muscle, kidney, spleen, stomach, pancreas and the pulp of immature feathers) were collected from 14 wild birds with neurological signs (abnormal behaviour, tremor, head drop, or abnormal body posture)

compatible with WNV infection. Seven of them were analysed only by real time RT-PCR (described below), and the rest were tested by real time RT-PCR (tissue samples) and ELISA + VNT (serum samples).

2.4. Enzyme-linked immunosorbent assay

All serum samples were analysed for WNV total antibodies by a commercial “blocking” ELISA kit (INgezim West Nile Compac, Ingenasa, Spain) suitable for any species (Sotelo et al., 2011), following the manufacturer’s protocol.

2.5. Virus-neutralization test (VNT)

Positive and doubtful sera by ELISA test were screened by micro virus-neutralization test (micro-VNT) in 96 well micro titre plates following a previously described protocol (Llorente et al., 2019), with a small modification (two fold serial dilutions of tested sera started at 1:10).

To assess specific neutralizing antibodies response against different flaviviruses, micro-VNTs were performed in parallel against WNV, USUV and BAGV, as they are flaviviruses that are known to cross-react in the ELISA tests, and there are chances that they could be circulating in the studied area. Viral strains used in this assay were: WNV strain E101 (GenBank accession no. AF260968), USUV SAAR-1776 (GenBank accession no. AY453412) and BAGV Spain/RLP-Hcc1/2010 (GenBank accession no. KR108244).

Antibodies were considered as specific for the virus giving VNT titres at least fourfold higher than titre obtained for any of the other viruses analysed (Calisher et al., 1989). When titre differences did not reach this threshold, the result was considered inconclusive and the specific virus which caused the infection could not be determined. Sera were considered positive if the result was positive/doubtful by ELISA and positive by VNT. Sera from experimentally infected animals with WNV, USUV and BAGV with known antibody titers, and sera negative for flavivirus antibodies, were included as positive and negative controls, respectively.

2.6. Viral genome detection assays

Viral RNA was extracted from tissue-homogenates (blood, brain, heart, intestine, liver, lung, muscle, kidney, spleen, stomach, pancreas and the pulp of immature feathers) using a previously method described by (Pérez-Ramírez et al., 2018).

Viral genome load was measured by a duplex real-time RT-PCR (dRRT-PCR), for the simultaneous and differential detection of Japanese Encephalitis (JE) and Ntaya serocomplexes viruses (Elizalde et al., 2020). Positive samples for JE complex were tested using a real-time multiplex RT-PCR that distinguishes efficiently between WNV lineage 1, WNV lineage 2 and USUV (del Amo et al., 2013). For both PCR methods, samples with Ct value > 40 were considered negative.

2.7. Statistical analysis

For each sampled bird an epidemiological survey was undertaken, which included individual data: name of the species, age (juvenile: <1 year, adult: >1 year), sex (male and female); and extrinsic animal data: season (spring, summer, autumn and winter) and geographical location (municipalities) of the rescue.

The prevalence of antibodies by ELISA and WNV specific antibodies determined by VNT were estimated from the ratio of positives to the total number of samples, with the exact binomial confidence intervals of 95 % based on the score method, which is derived from Wilson (1927). Associations between the serological results and explanatory variables (sex and age) were analysed using the Pearson’s Chi-squared. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. All statistical analysis was conducted in IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0 (Armonk, NY: IBM Corp.).

3. Results

Overall, 120 serum samples from wild birds gave a positive result by competition ELISA with an apparent seroprevalence of 31.25 % (95 % CI: 26.82–36.05) and 37 sera (9.64 %, 95 % CI: 7.07–13) were assigned as doubtful in this test.

A total of 90 out of the 157 positive/doubtful sera by ELISA were confirmed as flavivirus-neutralizing by the gold-standard technique VNT (57.32 %, 95 % CI: 49.50–64.80). Anti-WNV specific antibodies were detected in 70 samples (Table 1), indicating a true seroprevalence in wildlife birds from Extremadura rescued by WRC of 18.23 % (95 % CI: 14.69–22.40).

WNV specific antibodies were detected in 17 of the 56 species analysed (Table 2). Additionally, WNV was reported for the first time in Europe in black stork (*Ciconia nigra*), as well as in four more species from Spain (Table 2). Neutralizing WNV titres ranged from 1:10 to 1:1280.

Pelecaniformes (33.33 %, CI: 9.67–70), Accipitriformes (25.77 %, CI: 20.13–32.36), Strigiformes (22.92 %, CI: 13.31–36.54), Ciconiiformes (9.84 %, CI: 4.59–19.84), Falconiformes (9.09 %, CI: 2.42–26.79) and Passeriformes (3.85 %, CI: 0.68–18.89) were the orders with the highest WNV seroprevalences.

Anti-USUV specific antibodies were detected in four birds (Table 1): two Eurasian eagle owls (*Bubo bubo*), one griffon vulture (*Gyps fulvus*) and one great bustard (*Otis tarda*) (first detection in Europe) (Table 2). Neutralizing USUV titres ranged from 1:10 to 1:160.

Sixteen birds (4.17 %, 95 % CI: 2.58–6.66), presented VNT titres that did not allow to differentiate WNV, USUV or BAGV specific antibodies (Tables 1 and 2) and thus the flavivirus involved in the infection could not be identified. No sample was confirmed as BAGV seropositive.

Additionally, tissue samples from 14 birds with neurological signs were analysed by real-time RT-PCR for simultaneous detection and differentiation of flaviviruses of the JE and Ntaya serocomplexes. Three of them were positive to RNA from the JE serocomplex flaviviruses. Spleen and liver samples obtained from a griffon vulture collected in October 2017 were positive to JE serocomplex (Ct 34.59 and Ct 39.50, respectively). Subsequent analysis confirmed a WNV lineage 1 infection in both organs (Ct 34.26 and Ct 39.42, respectively). Furthermore, all collected tissues (liver, lung, heart, spleen, brain, kidney and the pulp of immature feathers) from two little owls (*Athene noctua*) obtained in October 2018 were also positive to RNA from JE serocomplex flaviviruses and later confirmed as WNV lineage 1, being the first time that WNV is detected in this species in Spain. The results of ELISA, VNT and PCR analyses in birds are included in Table 2.

The sex of 54 (29 females, 25 males) and the age of 330 individuals (121 adults, 209 juveniles) was determined in the epidemiological survey. Percentages of samples with specific WNV, USUV and undetermined flaviviruses by sex and age are shown in Table 3. Males had higher WNV seroprevalence (48 %) than females (3.45 %) ($p < 0.001$). Adults (30.58 %) had also a significant higher WNV seroprevalence than juvenile birds (9.09 %) ($p < 0.001$). Specific antibodies against WNV in juvenile birds were detected in specimens of 10 species belonging to the orders Accipitriformes (*Accipiter nisus*, *Aegypius monachus*, *Aquila chrysaetos*, *Circus gallicus*, *Gyps fulvus*, *Hieraetus pennatus* and *Milvus migrans*), Strigiformes (*Bubo bubo* and *Tyto alba*) and Ciconiiformes (*Ciconia nigra*). Presence of antibodies in juveniles were detected mainly in summer (8/19) and autumn (6/19) and throughout all years of study.

Spatially, WNV was detected in 53 out of 149 municipalities of Extremadura, with a wide distribution throughout the region, although the positive areas were concentrated in the central and western parts of Extremadura (Fig. 1). USUV antibodies were detected only in birds recovered from three municipalities (Fig. 1).

Only 16 animals were analysed (VNT) in late 2017 and WNV seroprevalence was 43.75 % (95 % CI: 23.10–66.82). The prevalence observed for WNV in 2018 was 21.60 % ($n = 125$; 95 % CI: 15.95–29.60), higher than in 2019 (14.81 %, $n = 243$; 95 % CI: 10.90–19.83).

Table 1

Presence of antibodies in serum samples from wild birds according to ELISA test and subsequent detection of specific antibodies by micro-VNT.

		n° of samples (%)	VNT test			
			n° WNV (%)	n° USUV (%)	n° undetermined flaviviruses [†] (%)	n° negative (%)
ELISA test	Positive	120 (31.25)	68 (56.67)	2 (1.67)	13 (10.83)	37 (30.83)
	Doubtful	37 (9.64)	2 (5.41)	2 (5.41)	3 (8.11)	30 (81.08)
	Negative	227 (59.11)	–	–	–	–
	Total	384	70 (18.23)	4 (1.04)	16 (4.16)	67 (17.44)

[†] undetermined flaviviruses: Positive samples in VNT test with an inconclusive result that did not allow to determine WNV, USUV or BAGV antibody specific responses.

The number of birds admitted in WRC increased over time, with admissions rising from 128 in 2018 to 243 in 2019. Admissions increased annually between summer and autumn seasons. Most WNV-positive birds were diagnosed in April and between September to December. Winter season had the highest WNV prevalence of the year (39.1 %, 95 % CI: 21.16–57.29). The detailed distribution by seasons can be seen in Fig. 2.

4. Discussion

This is the first study focusing on the presence of antibodies against WNV in birds in Extremadura. The seroprevalence found was 18.23 % for WNV, much higher than in other similar studies of birds admitted to WRC performed a decade ago in southern Spain (2.2 %, López et al., 2011) and in USA (2.8 %, Randall et al., 2012).

Wildlife rehabilitation centres regularly admit birds based on either disease signs or injuries, which might make them more susceptible to disease (Wendell et al., 2002; Randall et al., 2012). Hence, WNV seroprevalences detected in these birds could be biased or overestimated with respect to healthy birds in the field. However, authors such as López et al. (2011) and Camacho et al. (2016), found similar WNV seroprevalences both in healthy and WRC-cared birds, highlighting the usefulness of these centres to improve the detection of emerging pathogens that can affect domestic/wild animals and humans (Alba et al., 2014; Cox-Witton et al., 2014; Ana et al., 2017). Randall et al. (2012) observed that in studies at broad spatial scales, WNV antibody prevalence in peridomestic birds admitted to WRC was similar to that of free-ranging birds, although these approaches might have limitations at small spatial scales or over short-time periods. Our study comprises a wide territory and an extensive study period (2017–2019); thus, our results may represent an approximate estimation of the prevalence of WNV in free-ranging birds in the region.

The seroprevalence for WNV observed in wild birds in this study (18.23 %) was higher than that found in other European countries such as France (4.8 %, Jourdain et al., 2007), Croatia (12.7 %, Vilibic-Cavlek et al., 2019b), Czech Republic (5.9 %, Hubálek et al., 2008), Serbia (7.6 %, Vilibic-Cavlek et al., 2019a) and Italy (4.29 %, Llopis et al., 2015). Within Spain, in similar studies performed in Andalusia (bordering Extremadura in the south) showed generally lower seroprevalences, e.g. in Ferraguti et al. (2016) (0.38 %), Jurado-Tarifa et al. (2016) (0.67 %), García-Bocanegra et al. (2011a) (1 %), López et al. (2008) (1.47 % resident birds y 7.5 % trans-Saharan birds), Figuerola et al. (2008) (3.32 % resident birds and 5.23 % migratory birds), or also the 1.47 % found in resident birds in Catalonia (north-eastern Spain) (Alba et al., 2014).

However, studies in birds from Doñana National Park, an endemic WNV area, showed a seroprevalence similar to that described in this study (15.2 %) (López et al., 2011). Focusing on specific bird groups, higher seroprevalences have been found, with values above 50 % in common coots (*Fulica atra*) (Figuerola et al., 2007) or 23.80 % in Spanish imperial eagles (*Aquila adalberti*) in the region of Castilla-La Mancha (Höfle et al., 2008). Remarkably, in the present study, although these specific species have not been included, *Accipitriformes* species analysed (n = 194) reached a seroprevalence of 25.8 %.

The use of different detection methods, the range of host species

analysed, but, above all, the area and epidemic period studied, may explain the differences in antibodies prevalence in the different studies mentioned. In 2018, there was a spectacular increase in equine and human cases in Europe compared to previous years (Aberle et al., 2018; ECDC, 2018). Interestingly, in the years with full sampling (2017 is excluded), high seroprevalences were detected, suggesting that WNV circulation in the area of study was intense in the period coincident with a higher circulation in Europe (Aberle et al., 2018; Nagy et al., 2019; Michel et al., 2019). Further, the overall results found in this work in birds from Extremadura are in agreement with the high seroprevalence detected in horses in the same study region (19.72 %) (Guerrero-Carvajal et al., 2020).

A wide distribution of WNV has been observed in the region, being detected in 53 of the 149 municipalities sampled, covering broad areas from Extremadura as has been observed in horses (Guerrero-Carvajal et al., 2020). Therefore, wide areas of Extremadura are at risk of WNV outbreaks, just as it was proposed in the prediction model by Sánchez-Gómez et al. (2017). In endemic areas, such as western Andalusia, which is crossed by an important route for different migratory bird species between Europe and Africa (including Extremadura), a wide distribution of WNV has been observed (García-Bocanegra et al., 2011b; Jurado-Tarifa et al., 2016).

The observed seroprevalence followed a seasonal pattern, with an increase in the detection of positives in autumn and winter, as other authors observed in nearby regions (Figuerola et al., 2008). This was expected, since the probability of infection and subsequent antibody response in exposed birds grow as the vector's period of activity progresses, with increasing viral replication and infection cycles, resulting in a greater number of seropositive animals at the end of the season or even in winter (Pérez Ruiz et al., 2011). However, these seasonality-related results must be interpreted with caution because the duration of anti-WNV antibodies is not well established in most species of birds (Pérez-Ramírez et al., 2014). For instance, antibodies have been observed to last for at least 15 months in *Columba livia* (Gibbs et al., 2005) or up to three years in *Passer domesticus* (Nemeth et al., 2009). On the other hand, seronegativization has been ascertained in common coots (*Fulica atra*) during a follow-up study in Doñana spanning three transmission seasons (Figuerola et al., 2007). Despite these limitations, this study presents two lines of evidence supporting active circulation among wild birds from Extremadura from 2017 to 2019: on the one hand, the detection of WNV lineage 1 in tissues of birds that died with compatible symptoms, on the other hand, the presence of WNV antibodies in juvenile birds belonging to stable populations of resident species (this aspect is further discussed below). Altogether, these data support the usefulness of the analysis of samples obtained from WRC to gain a wider perspective of the epidemiological situation in the analysed area.

Extremadura holds an extraordinary ornithological richness, being the geopolitical region with the widest extension of Important Bird Areas (IBA) in Europe (a staggering 75 % of its total area of 3 million hectares). A 30 % of the regional territory is protected and classified as a Site of Community Importance (SCI), and 25.15 % of its surface is classified as ZEPAs (Special Protection Area for Birds) (Hernández-Mogollón et al., 2013). Furthermore, 2 out of the 3048

Table 2

Results obtained from ELISA, VNT and PCR tests for detection of flaviviruses in wild birds by order/species admitted to rehabilitation centres in Extremadura (Spain) during 2017–2019 seasons. PCR analysis involved methods able to detect and differentiate a wide range of avian flaviviruses. When positive, the virus/lineage identified is indicated in parentheses.

Order ^a	Species	R/ M	Antibodies detection			VNT test (n)			WNV (%) Seroprevalence	PCR test (n)	
			Analysed	Positives	Doubtful	WNV	USUV	Undetermined Flaviviruses		Analysed	Result
Accipitriformes	<i>Accipiter gentilis</i> (n = 2)	R	2	0	1	0	0	0	0.00	1	Negative
	<i>Accipiter nisus</i> (n = 6)	R	5	3	0	3	0	0	60.00	1 [‡]	Negative
	<i>Aegypius monachus</i> (n = 20)	R	19	9	4	4	0	1	21.05	1	Negative
	<i>Aquila chrysaetos</i> (n = 5)	R	5	4	0	3	0	1	60.00	–	–
	<i>Buteo buteo</i> (n = 8)	R	8	1	1	0	0	0	0.00	–	–
	<i>Circus gallicus</i> (n = 7)	M	7	6	1	5	0	0	71.43	–	–
	<i>Circus aeruginosus</i> (n = 4)	R	4	1	1	1	0	1	25.00	–	–
	<i>Circus pygargus</i> (n = 1)	M	1	1	0	0	0	0	0.00	–	–
	<i>Elanus caeruleus</i> (n = 1)	R	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Gyps fulvus</i> (n = 111)	R	110	45	17	20	1	5	18.18	4 ⁺ +1	1 (WNV L1); 4 Negative
	<i>Hieraaetus pennatus</i> (n = 13)	M	13	8	0	8	0	0	61.54	–	–
	<i>Milvus migrans</i> (n = 12)	M	12	8	1	4	0	0	33.33	–	–
	<i>Milvus milvus</i> (n = 7)	R	6	4	2	2	0	0	33.33	1 [^]	Negative
	<i>Pernis apivorus</i> (n = 1)	M	1	1	0	0	0	0	0.00	–	–
Apodiformes	<i>Apus apus</i> (n = 7)	M	7	0	0	–	–	–	0.00	–	–
Bucerotiformes	<i>Apus pallidus</i> (n = 8)	M	8	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Upupa epops</i> (n = 1)	R	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
Charadriiformes	<i>Chroicocephalus ridibundus</i> (n = 1)	R/ M	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Larus fuscus</i> (n = 2)	R/ M	2	0	1	0	0	0	0.00	–	–
Ciconiiformes	<i>Ciconia ciconia</i> (n = 58)	R/ M	58	7	3	5	0	3	8.62	–	–
	<i>Ciconia nigra</i> ¹ (n = 3)	M	3	1	0	1	0	0	33.33	–	–
Columbiformes	<i>Columba livia</i> (n = 1)	R	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
Coraciiformes	<i>Alcedo atthis</i> (n = 1)	R	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Merops apiaster</i> (n = 2)	M	2	0	0	–	–	–	0	–	–
Cuculiformes	<i>Cuculus canorus</i> (n = 1)	M	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
Falconiformes	<i>Falco columbarius</i> (n = 1)	M	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Falco naumanni</i> (n = 7)	M	7	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Falco peregrinus</i> (n = 1)	R	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Falco tinnunculus</i> (n = 14)	R	14	3	0	2	0	1	14.29	–	–
Gruiformes	<i>Gallinula chloropus</i> (n = 1)	R	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
Otidiformes	<i>Grus grus</i> (n = 2)	M	2	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Otis tarda</i> ¹ (n = 1)	R	1	1	0	0	1	0	0.00	–	–
	<i>Chloris chloris</i> (n = 1)	R	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Coloeus monedula</i> (n = 1)	R	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
Passeriformes	<i>Corvus corax</i> (n = 7)	R	7	2	0	0	0	0	0.00	1	Negative
	<i>Cyanopica cooki</i> (n = 1)	R	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Delichon urbicum</i> (n = 2)	M	2	1	0	1	0	0	50.00	–	–
	<i>Garrulus glandarius</i> (n = 1)	R	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Motacilla alba</i> (n = 1)	R	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Order ^a	Species	R/ M	Antibodies detection			VNT test (n)			WNV (%) Seroprevalence	PCR test (n)	
			Analysed	Positives	Doubtful	WNV	USUV	Undetermined Flaviviruses		Analysed	Result
Pelecaniformes	<i>Passer domesticus</i> (n = 2)	R	2	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Pica pica</i> (n = 6)	R	6	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Pyrrhocorax pyrrhocorax</i> (n = 1)	R	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Sturnus unicolor</i> (n = 2)	R	2	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Turdus merula</i> (n = 1)	R	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Ardea cinerea</i> (n = 3)	R	3	1	1	2	0	0	66.67	–	–
	<i>Ardea purpurea</i> (n = 1)	M	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Bubulcus ibis</i> (n = 1)	R	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Plegadis falcinellus</i> (n = 1)	R	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Asio otus</i> (n = 2)	R	2	0	0	–	–	–	0.00	–	–
Strigiformes	<i>Athene noctua</i> (n = 6)	R	4	0	0	–	–	–	0.00	2 ⁺	2 (WNV L1)
	<i>Bubo bubo</i> (n = 21)	R	21	8	2	4	2	3	19.05	–	–
	<i>Otus scops</i> (n = 1)	R	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
	<i>Strix aluco</i> (n = 5)	R	5	1	0	1	0	0	20.00	–	–
Suliformes	<i>Tyto alba</i> (n = 13)	R	12	4	2	4	0	1	33.33	1 ⁺ +1	Negative
	<i>Phalacrocorax carbo</i> (n = 1)	R	1	0	0	–	–	–	0.00	–	–
			384	12	37	70	4	16		14	3

^a Classification based on International Ornithologists' Union (<https://www.worldbirdnames.org/index.html>). The migratory behaviour of every species is indicated (R, resident; M, migratory) (<https://www.seo.org>). Species where WNV/USUV has been detected for first time in Spain are marked in bold, and with "+" if it has also been in Europe. Value marked with "+" if was only analysed by PCR test.

^b Undetermined flaviviruses: Positive samples by VNT with inconclusive result that did not allow to determine WNV, USUV or BAGV antibody specific responses.

Table 3

Percentage of antibodies against WNV, USUV and undetermined flaviviruses according to VNT test by sex and age of birds and significance level (Pearson's Chi-squared) with respect to WNV.

		Total (n)	% Undetermined flaviviruses ^a (CI)	% USUV (CI)	% WNV (CI)	p – value WNV
Sex	Male ^a	25	8.00 (2.22 – 24.96)	0.0 (0.0 – 12.87)	48.00 (30.03 – 66.50)	< 0.001
	Female	29	0.0 (0.0 – 11.35)	10.34 (3.58 – 26.38)	3.45 (0.61 – 17.17)	
Age	Adults ^a	121	4.96 (2.29 – 10.40)	2.48 (0.85 – 7.04)	30.58 (23.07 – 39.28)	< 0.001
	Juvenile	209	1.91 (0.74 – 4.75)	0.0 (0.0 – 1.78)	9.09 (5.90 – 13.76)	

^a Reference category. CI = 95 % confidence interval.

^b Undetermined flaviviruses: Positive samples by VNT with inconclusive result that did not allow to determine WNV, USUV or BAGV antibody specific responses.

wetlands existing in this region are classified as International Importance or Ramsar areas, both in Badajoz: Orellana reservoir and the Albuera lagoon complex, as habitats for aquatic birds.

In addition to the abundance and diversity of birds in the study region, it must be remarked that there are currently 33 species of mosquitoes catalogued in it, being *Cx. pipiens* the most frequent and widespread, and with presence of *Cx. univittatus* and the newly detected *Cx. perexiguus* (Bravo-Barriga et al., 2021), which are also competent for WNV transmission.

The risk of WNV outbreaks in Extremadura is high, given the risk factors present, associated with richness in habitats suitable to withhold

high avian reservoir host and mosquito vector populations, and the situation revealed in this study, with relevant prevalences found for this pathogen in the reservoir hosts.

WNV antibodies have been detected in 18 out of 56 species analysed (reflecting the ornithological richness of Extremadura) including first reports of WNV infection in 4 species in Spain and in 1 species in Europe (Table 2). In some orders, such as Pelecaniformes, Accipitriformes and Strigiformes, we found WNV seroprevalences above 20 %. Our results are in agreement with other studies showing that raptors are highly susceptible to WNV infection (Nemeth et al., 2006; Gamino and Höfle, 2013; Vidana et al., 2020). In this regard, WNV has been detected in Spain in raptor species (Jiménez-Clavero et al., 2008; López et al., 2011; Jurado-Tarifa et al., 2016; Sánchez et al., 2017).

Griffon vulture and white stork are the species most represented in our study (n = 111 and n = 58, respectively). The large number of griffon vultures examined, many of them with neurological symptoms, is of concern. Prior to the detection observed in this study in griffon vulture, WNV lineage 1 had only been detected in one specimen from Castilla-La Mancha (Sánchez et al., 2017).

WNV seroprevalence in white storks was 8.62 %; moreover, 5.17 % of them were positive in ELISA but inconclusive in the differential flavivirus diagnosis. Other studies on this species in Spain indicate seroprevalences between 4.4 and 14 % (López et al., 2011; Camacho et al., 2016). Extremadura shelters one of the largest populations of white storks that are adapted to urban and rural habitats (<https://www.seo.org/>) and due to its partially migratory nature, its role in the spread of WNV in Extremadura should not be ruled out (Malkinson et al., 2002). Further, the first detection of WNV in a juvenile black stork from Europe was reported. As it is an endangered species, it would be advisable to inquire into the potential impact of WNV on its population.

With regard to sex, the observed WNV seroprevalence was higher in males than in females. These results must be interpreted with caution, since most species analysed are monomorphic and sex identification was only possible in 54 birds, of which 29 belonged to the order

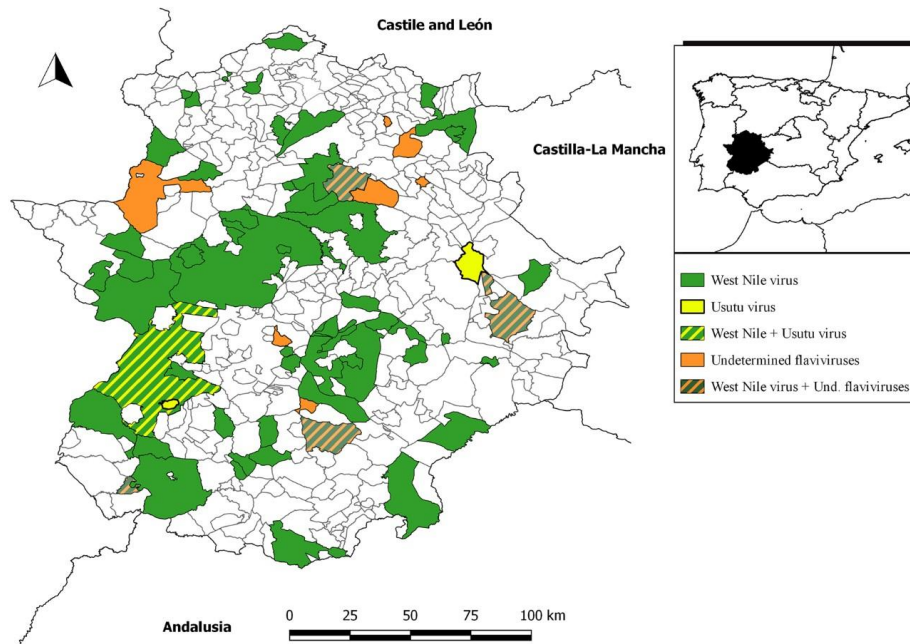


Fig. 1. Map of the surveyed area (scale NUTS 2: ES43) showing the detection of different flavivirus species detected in wild birds sampled in Extremadura by Rehabilitation Centres. Each colour represents the flavivirus species identified in each municipality (NUTS 3). Map created by QGIS. 3.12.0 (2020). QGIS Geographic Information System. Open-Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.org>.

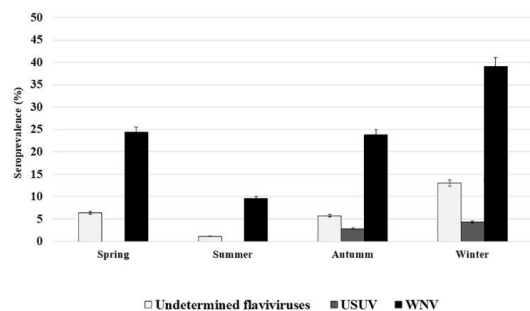


Fig. 2. Temporal follow-up by seasons of flaviviruses prevalence detected in birds in Extremadura arrived at wildlife rehabilitation centres, period 2017-2019. Error bars show 95 % confidence intervals.

Accipitriformes. Consequently this analysis is biased towards this order. Previous studies, such as those carried out in crows by Decarlo et al. (2011) or in sparrows by Medrouh et al. (2020) did not find significant differences between sexes. However, other authors found higher prevalence in females than in males, possibly due to the incubation tasks which result in a longer time spent in one place and a greater probability of being bitten by vector mosquitoes (Egizi et al., 2014). Sex dependence over WNV infection likelihood would probably rely on biological, ecological and behavioural features of each species involved, differing from one species to another and are still far from being understood.

According to age, higher seroprevalences to WNV were found in adults (>1 year) than in juveniles (<1 year). This is in line with other authors, who highlight higher percentages of positivity over the years, due to past WNV infections (persistence of antibodies and survival to the

initial infection) (Martínez-de la Puente et al., 2018; Busquets et al., 2019). Furthermore, the detection of WNV antibodies in juvenile birds is of utmost importance since it is indicative of recent viral circulation in the area (Ferraguti et al., 2016; Camacho et al., 2016; Martínez-de la Puente et al., 2018). The presence of antibodies in juvenile birds obtained by maternal transference to offspring cannot be discarded. Nevertheless, the duration of them has not been observed in birds for more than 1 month after birth (Pérez-Ramírez et al., 2014).

Usutu virus shares many epidemiological, ecological, structural and antigenic characteristics with WNV. Despite the ELISA kit used for screening (INgezim West Nile Compac 10.WNV.k3, Ingenasa, Spain) is designed for the detection of WNV antibodies, it partially cross-reacts with other flaviviruses, including USUV (Llorente et al., 2019), allowing the detection of specific USUV antibodies, but with unknown efficacy. Consequently, the initial screening based in an ELISA designed for WNV antibodies detection and not for USUV implies that the number of sera containing specific USUV antibodies is likely underestimated. Having this in mind, the results obtained with regard to USUV infections must be interpreted qualitatively rather than quantitatively and real seroprevalence cannot be determined. USUV neutralizing antibodies were detected in 4 birds belonging to 3 different species: Eurasian eagle owl, griffon vulture and great bustard (the latter being the first USUV infection in this species described in Europe). So, it would be interesting to carry out a serosurveillance study to know the actual incidence for USUV in order to better assess risks in other populations.

5. Conclusion

For the first time, a high prevalence and active circulation of WNV has been evidenced in birds from Extremadura, a wide region of western Spain, during the period 2017–2019. Due to the detection of USUV infections, studies focused on this flavivirus are advisable to perform in order to know its actual prevalence in birds.

The detection of flavivirus antibodies in 19 species, some of them classified as “near threatened”, “vulnerable” or “in danger of extinction”, could have ecological implications for their populations, indicating the need for deeper studies aimed at clarifying the risk these flaviviruses represent and translate this knowledge into conservation policies. Furthermore, this study reports for the first time the detection of WNV and USUV in certain bird species from Europe and/or Spain, meaning a step forward in the epidemiological knowledge of these arboviruses.

Due to the important eco-epidemiological role of birds in the transmission of WNV and USUV, and the prevalence for WNV found in Extremadura, it would be advisable to improve and reinforce surveillance and control programs for these viruses in order to enable efficient and timely detection protocols of possible outbreaks in humans and equids.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Acknowledgments

Research funded by Consejería de Economía e Infraestructura of the Junta de Extremadura and the European Regional Development Fund, a Way to Make Europe, through the research project (grant numbers IB16135 and GR18148) and the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA-CISA) (grant number E-RTA2015-00002-C02-00).

Fátima Guerrero-Carvajal is supported by “Ayudas a la Formación Investigador Predoctoral 2018” Formative contract (PD18056) from the Extremadura regional government and Pilar Aguilera-Sepúlveda is funded by an FPI predoctoral fellowship from INIA/CISA.

The authors are grateful to the Red de Investigación en Sanidad Animal (RISA).

We want to thank for their collaboration in collecting bird samples to Veterinarians Susana Sánchez Cuerda and María Galán Carrillo from the Rehabilitation Centre “Los Hornos” and also to Jara López Jaraquemada from the Rehabilitation Centre “Amus”.

References

- Abad-Cobo, A., Llorente, F., Barbero, M., del, C., Cruz-López, F., Forés, P., Jiménez-Clavero, M.Á., 2017. Serosurvey reveals exposure to West Nile virus in asymptomatic horse populations in central Spain prior to recent disease foci. *Transbound. Emerg. Dis.* 64 (5), 1387–1392. <https://doi.org/10.1111/tbed.12510>.
- Aberle, S.W., Kolodziejek, J., Jungbauer, C., Stiasny, K., Aberle, J.H., Zoufaly, A., Hourfar, M.K., Weidner, N., Nowotny, N., 2018. Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. *Euro Surveill.* 23 (43) pii=1800545.
- Agüero, M., Fernández-Pinero, J., Buitrago, D., Sánchez, A., Elizalde, M., Miguel, E.S., Villalba, R., Llorente, F., Jiménez-Clavero, M.Á., 2011. Bagaza virus in partridges and pheasants, Spain, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 17 (8), 1498–1501. <https://doi.org/10.3201/eid1708.110077>.
- Alba, A., Allepuz, A., Napp, S., Soler, M., Selga, I., Aranda, C., Casal, J., Pages, N., Hayes, E.B., Busquets, N., 2014. Ecological surveillance for West Nile in Catalonia (Spain). Learning from a five-year period of follow-up. *Zoonoses Public Health* 61 (3), 181–191. <https://doi.org/10.1111/zph.12048>.
- Ana, A., Perez Andrés, M., Julia, P., Pedro, P., Arno, W., Kimberly, V.W., Alvarez, J., Michelle, W., 2017. Syndromic surveillance for West Nile virus using raptors in rehabilitation. *BMC Vet. Res.* 13 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1292-0>.
- Bakonyi, T., Ivanics, É., Erdélyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Weissenböck, H., Nowotny, N., 2006. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 12 (4), 618–623. <https://doi.org/10.3201/eid1204.051379>.
- Barrett, A.D.T., 2018. West Nile in Europe: an increasing public health problem. *J. Travel Med.* 25 (1) <https://doi.org/10.1093/jtm/tay096>.
- Beck, H.E., Zimmermann, N.E., McVicar, T.R., Vergopolan, N., Berg, A., Wood, E.F., 2018. Present and future köppen-geiger climate classification maps at 1-km resolution. *Sci. Data* 5 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.214>.
- Benzarti, E., Linden, A., Desmecht, D., Garigliani, M., 2019. Mosquito-borne epornitic flaviviruses: an update and review. *J. Gen. Virol.* 100 (2), 119–132. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001203>.
- Bernabeu-Wittel, M., Ruiz-Pérez, M., Del Toro, M.D., Aznar, J., Muniain, Á., De Ory, F., Domingo, C., Pachón, J., 2007. West Nile virus past infections in the general population of Southern Spain. *Enferm. Microbiol. Clin.* 25 (9), 561–565. <https://doi.org/10.1157/13111181>.
- Bondre, V.P., Sapkal, G.N., Yergolkar, P.N., Fulmali, P.V., Sankararaman, V., Ayachit, V.M., Mishra, A.C., Gore, M.M., 2009. Genetic characterization of Bagaza virus (BAGV) isolated in India and evidence of anti-BAGV antibodies in sera collected from encephalitis patients. *J. Gen. Virol.* 90 (11), 2644–2649. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012336-0>.
- Bravo-Barriga, D., Gouveia De Almeida, A.P., Delacour-Estrella, S., Estrada-Peña, R., Lucientes, J., Sánchez-murillo, J.M., Frontera, E., 2021. Mosquito fauna in Extremadura (western Spain): updated catalog with new records, distribution maps, and medical relevance. *J. Vector Ecol.* 46 (1), 1–11. In press.
- Busquets, N., Alba, A., Allepuz, A., Aranda, C., Núñez, J.L., 2008. Usutu virus sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 14 (5), 861–863. <https://doi.org/10.3201/eid1405.071577>.
- Busquets, N., Laranjo-González, M., Soler, M., Nicolás, O., Rivas, R., Talavera, S., Villalba, R., Miguel, E.S., Torner, N., Aranda, C., Napp, S., 2019. Detection of West Nile virus lineage 2 in North-Eastern Spain (Catalonia). *Transbound. Emerg. Dis.* 66 (2), 617–621. <https://doi.org/10.1111/tbed.13086>.
- Caballero-Gómez, J., Cano-Terriza, D., Lecollinet, S., Carbonell, M.D., Martínez-Valverde, R., Martínez-Navado, E., García-Párraga, D., Lowenski, S., García-Bocanegra, I., 2020. Evidence of exposure to zoonotic flaviviruses in zoo mammals in Spain and their potential role as sentinel species. *Vet. Microbiol.* 247, 108763. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108763>.
- Calisher, C.H., Karabatsos, N., Dalrymple, J.M., Shope, R.E., Porterfield, J.S., Westaway, E.G., Brandt, W.E., 1989. Antigenic relationships between Flaviviruses as determined by Cross-neutralization Tests with polyclonal Antisera. *J. Gen. Virol.* 70, 37–43.
- Camacho, M.C., Hernández, J.M., Lima-Barbero, J.F., Höfle, U., 2016. Use of wildlife rehabilitation centres in pathogen surveillance: a case study in white storks (*Ciconia ciconia*). *Prev. Vet. Med.* 130, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.06.012>.
- Carletti, F., Colavita, F., Rovida, F., Percivalle, E., Baldanti, F., Ricci, I., Liberato, C.D., Rosone, F., Messina, F., Lalle, E., Bordin, L., Vairo, F., Copabianchi, M.R., Ippolito, G., Capiello, G., Spanò, A., Meschi, S., Castilletti, C., 2019. Expanding Usutu virus circulation in Italy: detection in the Lazio region, central Italy, 2017 to 2018. *Euro Surveill.* 24 (3) <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.3.1800649>.
- Chaintoutis, S.C., Papa, A., Pervanidou, D., Dovas, C.I., 2019. Evolutionary dynamics of lineage 2 West Nile virus in Europe, 2004–2018: phylogeny, selection pressure and phylogeography. *Mol. Phylogenet. Evol.* 141, 106617 <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106617>.
- Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E., Rios, M., 2015. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed. Res. Int.* 2015, 376230 <https://doi.org/10.1155/2015/376230>.
- Cheng, Y., Tjaden, N.B., Jaeschke, A., Lühken, R., Ziegler, U., Thomas, S.M., Beierkuhnlein, C., 2018. Evaluating the risk for Usutu virus circulation in Europe: comparison of environmental niche models and epidemiological models. *Int. J. Health Geogr.* 17 (1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12942-018-0155-7>.
- Clé, M., Beck, C., Salinas, S., Lecollinet, S., Gutierrez, S., Van de Perre, P., Baldet, T., Fouligne, V., Simonin, Y., 2019. Usutu virus: a new threat? *Epidemiol. Infect.* 147, e232. <https://doi.org/10.1017/S0950268819001213>.
- Decarlo, C.H., Clark, A.B., McGowan, K.J., Ziegler, P.E., Glaser, A.L., Szonyi, B., Mohammed, H.O., 2011. Factors associated with the risk of West Nile virus among crows in New York state. *Zoonoses Public Health* 58 (4), 270–275. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2010.01346.x>.
- Del Amo, J., Sotelo, E., Fernández-Pinero, J., Gallardo, C., Llorente, F., Jiménez-Clavero, M.Á., 2013. A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus. *J. Virol. Methods* 189 (2), 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.02.019>.
- Digoutte, J.P., 1978. Bagaza (BAG). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27 (2), 376–377. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1978.27.376>.
- Egizi, A.M., Farajollahi, A., Fonseca, D.M., 2014. Diverse host feeding on nesting birds may limit early-season West Nile virus amplification. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 14 (6), 447–453. <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1536>.
- Elizalde, M., Cano-Gómez, C., Llorente, F., Pérez-Ramírez, E., Casades-Martí, L., Aguilera-Sepúlveda, P., Ruiz-Fons, F., Jiménez-Clavero, M.Á., Fernández-Pinero, J., 2020. A duplex quantitative real-time reverse transcription-PCR for simultaneous detection and differentiation of Flaviviruses of the Japanese Encephalitis and Ntaya serocomplexes in birds. *Front. Vet. Sci.* 7, 203. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00203>.
- European Centre for Disease Prevention and Control, 2018. West Nile Virus Infection. Annual epidemiological report for 2018. ECDC, Stockholm, Sweden. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-infection-annual-epidemiological-report-2018#no-link>.
- Fernández-Pinero, J., Davidson, I., Elizalde, M., Perk, S., Khinich, Y., Jiménez-Clavero, M.Á., 2014. Bagaza virus and Israel Turkey meningoencephalomyelitis virus are a single virus species. *J. Gen. Virol.* 95, 883–887. <https://doi.org/10.1099/vir.0.061465-0>.
- Ferraguti, M., de la Puente, J.M., Soriguer, R., Llorente, F., Jiménez-Clavero, M.Á., Figuerola, J., 2016. West Nile virus-neutralizing antibodies in wild birds from southern Spain. *Epidemiol. Infect.* 144 (9), 1907–1911. <https://doi.org/10.1017/S0950268816000133>.
- Figuerola, J., Soriguer, R., Rojo, G., Tejedor, C.G., Jiménez-Clavero, M.Á., 2007. Seroconversion in wild birds and local circulation of West Nile virus. *Spain. Emerg. Infect. Dis.* 13 (12), 1915–1917. <https://doi.org/10.3201/eid1312.070343>.

- Figuerola, J., Jiménez-Clavero, M.Á., López, G., Rubio, C., Soriguer, R., Gómez-Tejedor, C., Tenorio, A., 2008. Size matters: west Nile Virus neutralizing antibodies in resident and migratory birds in Spain. *Vet. Microbiol.* 132 (1–2), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.04.023>.
- Gamino, V., Höfle, U., 2013. Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review. *Vet. Res.* 44 (1), 39. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-39>.
- García-Bocanegra, I., Jaén-Téllez, J.A., Napp, S., Arenas-Montes, A., Fernández-Morente, M., Fernández-Molera, V., Arenas, A., 2011a. West Nile fever outbreak in horses and humans, Spain, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 17 (2), 2397–2399. <https://doi.org/10.1111/tbed.12742>.
- García-Bocanegra, I., Busquets, N., Napp, S., Alba, A., Zorrilla, I., Villalba, R., Arenas, A., 2011b. Serosurvey of West Nile virus and other flaviviruses of the Japanese encephalitis antigenic complex in birds from Andalusia, southern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11 (8), 1107–1113. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0237>.
- García-Bocanegra, I., Jaén-Téllez, J.A., Napp, S., Arenas-Montes, A., Fernández-Morente, M., Fernández-Molera, V., Arenas, A., 2012. Monitoring of the West Nile virus epidemic in Spain between 2010 and 2011. *Transbound. Emerg. Dis.* 59 (5), 448–455. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01298.x>.
- García-Bocanegra, I., Zorrilla, I., Rodríguez, E., Rayas, E., Camacho, L., Redondo, I., Gómez-Guillamón, F., 2013. Monitoring of the Bagaza Virus epidemic in wild bird species in Spain, 2010. *Transbound. Emerg. Dis.* 60 (2), 120–126. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01324.x>.
- García-Bocanegra, I., Paniagua, J., Gutiérrez-Guzmán, A.V., Lecollinet, S., Boadella, M., Arenas-Montes, A., Cano-Terriza, D., Lowenski, S., Gortázar, C., Höfle, U., 2016. Spatio-temporal trends and risk factors affecting West Nile virus and related flavivirus exposure in Spanish wild ruminants. *BMC Vet. Res.* 12 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-0160876-4>.
- García-Bocanegra, I., Belkhiria, J., Napp, S., Cano-Terriza, D., Jiménez-Ruiz, S., Martínez-López, B., 2018a. Epidemiology and spatio-temporal analysis of West Nile virus in horses in Spain between 2010 and 2016. *Transbound. Emerg. Dis.* 65 (2), 567–577. <https://doi.org/10.1111/tbed.12742>.
- García-Bocanegra, I., Jurado-Tarifa, E., Cano-Terriza, D., Martínez, R., Pérez-Marín, J.E., Lecollinet, S., 2018b. Exposure to West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in dogs in Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* 65 (3), 765–772. <https://doi.org/10.1111/tbed.12801>.
- García-San Miguel, L., Sierra Moros, M.J., Pérez Formigó, J., Suárez Rodríguez, B., Simón Soria, F., 2020. Meningoencefalitis Por Virus Del Nilo Occidental En España (2a Actualización). Evaluación Rápida De Riesgo. Ministerio De Sanidad, Dirección General De Salud Pública. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias Madrid.
- Gibbs, S.E.J., Hoffman, D.M., Stark, L.M., Marlenee, N.L., Blitvich, B.J., Beaty, B.J., Stallknecht, D.E., 2005. Persistence of antibodies to West Nile virus in naturally infected rock pigeons (*Columba livia*). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12 (5), 665–667. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.5.665-667.2005>.
- Guerrero-Carvajal, F., Bravo-Barriga, D., Martín-Cuervo, M., Aguilera-Sepúlveda, P., Ferraguti, M., Jiménez-Clavero, M.Á., Llorente, F., Alonso, J.M., Frontera, E., 2020. Serological evidence of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids from western Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* tbed.13810. <https://doi.org/10.1111/tbed.13810>.
- Hernández-Mogollón, J.M., Campón Cerro, A.M., Clemente, E.D., 2013. El turista rural en entornos de alta calidad medioambiental. *Rev. análisis turístico.* 16 (2), 21–31.
- Höfle, U., Blanco, J.M., Crespo, E., Naranjo, V., Jiménez-Clavero, M.Á., Sánchez, A., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2008. West Nile virus in the endangered Spanish imperial eagle. *Vet. Microbiol.* 129 (1–2), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.006>.
- Höfle, U., Gamino, V., de Mera, I.G.F., Mangold, A.J., Ortiz, J.A., de la Fuente, J., 2013. Usutu virus in migratory song thrushes. *Spain. Emerg. Infect. Dis.* 19 (7), 1173–1175. <https://doi.org/10.3201/eid1907.130199>.
- Jiménez-Clavero, M.Á., Sotelo, E., Fernández-Pinero, J., Llorente, F., Blanco, J.M., Rodríguez-Ramos, J., Pérez-Ramírez, E., Höfle, U., 2008. West Nile virus in golden eagles, Spain, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14 (9), 1489–1491. <https://doi.org/10.3201/eid1409.080190>.
- Jiménez-Clavero, M.Á., Llorente, F., Sotelo, E., Soriguer, R., Gómez-Tejedor, C., Figuerola, J., 2010. West Nile virus serosurveillance in horses in Doñana, Spain, 2005 to 2008. *Vet. Rec.* 167 (10), 379–380. <https://doi.org/10.1136/vr.c3155>.
- Jourdain, E., Toussaint, Y., Leblond, A., Bicot, D.J., Sabatier, P., Gauthier-Clerc, M., 2007. Bird species potentially involved in introduction, amplification, and spread of West Nile virus in a Mediterranean wetland, the Camargue (Southern France). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7 (1), 15–33. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0543>.
- Jurado-Tarifa, E., Napp, S., Lecollinet, S., Arenas, A., Beck, C., Cerdà-Cuellar, M., Fernández-Morente, M., García-Bocanegra, I., 2016. Monitoring of West Nile virus, Usutu virus and Meabon virus in waterfowl used as decoys and wild raptors in southern Spain. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 49, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.10.001>.
- Kaptoul, D., Viladrich, P.F., Domingo, C., Niubó, J., Martínez-Yélamos, S., De Ory, F., Tenorio, A., 2007. West Nile virus in Spain: report of the first diagnosed case (in Spain) in a human with aseptic meningitis. *Scand. J. Infect. Dis.* 39 (1), 70–71. <https://doi.org/10.1080/00365540600740553>.
- Kramer, L.D., Styer, L.M., Ebel, G.D., 2008. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu. Rev. Entomol.* 53 (1), 61–81. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093258>.
- Llopis, I.V., Rossi, L., Di Gennaro, A., Mosca, A., Teodori, L., Tomassone, L., Grego, E., Monaco, F., Larusso, A., Savini, G., 2015. Further circulation of West Nile and Usutu viruses in wild birds in Italy. *Infect. Genet. Evol.* 32, 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.024>.
- Llorente, F., Pérez-Ramírez, E., Fernández-Pinero, J., Soriguer, R., Figuerola, J., Jiménez-Clavero, M.Á., 2013. Flaviviruses in game birds, southern Spain, 2011–2012. *Emerg. Infect. Dis.* 19 (6), 1023–1025. <https://doi.org/10.3201/eid1906.130122>.
- Llorente, F., García-Irazabal, A., Pérez-Ramírez, E., Cano-Gómez, C., Sarasa, M., Vázquez, A., Jiménez-Clavero, M.Á., 2019. Influence of flavivirus co-circulation in serological diagnostics and surveillance: a model of study using West Nile, Usutu and Bagaza viruses. *Transbound. Emerg. Dis.* 66 (5), 2100–2106. <https://doi.org/10.1111/tbed.13262>.
- López, G., Jiménez-Clavero, M.Á., Tejedor, C.G., Soriguer, R., Figuerola, J., 2008. Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in Spain is related to the behavior of migratory birds. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8 (5), 615–621. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0200>.
- López, G., Jiménez-Clavero, M.Á., Vázquez, A., Soriguer, R., Gómez-Tejedor, C., Tenorio, A., Figuerola, J., 2011. Incidence of West Nile virus in birds arriving in wildlife rehabilitation centers in Southern Spain. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11 (3), 285–290. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0232>.
- López-Ruiz, N., Montaña-Remacha, M., del, C., Durán-Pla, E., Pérez-Ruiz, M., Navarro-Marí, J.M., Salamanca-Rivera, C., Miranda, B., Oyonarte-Gómez, S., Ruiz-Fernández, J., 2018. West Nile virus outbreak in humans and epidemiological surveillance, west Andalusia, Spain, 2016. *Euro Surveill.* 23 (14), 17–00261.
- Malkinson, M., Banet, C., Weisman, Y., Pokamunski, S., King, R., Drouet, M.T., Deubel, V., 2002. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (4), 392–397. <https://doi.org/10.3201/eid804.010217>.
- MAPAMA, 2020. Enfermedad Fiebre Del Nilo Occidental (West Nile). www.mapa.es/ganaderia/mapa.es.
- Martínez-De La Puente, J., Ferraguti, M., Ruiz, S., Roiz, D., Llorente, F., Pérez-Ramírez, E., Jiménez-Clavero, M.Á., Soriguer, R., Figuerola, J., 2018. Mosquito community influences West Nile virus seroprevalence in wild birds: implications for the risk of spillover into human populations. *Sci. Rep.* 8, 2599. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20825-z>.
- Mayordomo, S., Prieta, J., Cardallaguet, M., 2015. Aves de Extradadura 5, 2009–2014. McGill, M.W., Rowan, A.N., 1989. Biological effects of blood loss: implications for sampling volumes and techniques. *ILAR J.* 31, 5–20. <https://doi.org/10.1093/ilar.31.4.5>.
- Medrouh, B., Lafri, I., Beck, C., Leulmi, H., Akkou, M., Abbad, L., Lafri, M., Bitam, I., Lecollinet, S., 2020. First serological evidence of West Nile virus infection in wild birds in Northern Algeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 69, 101415. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101415>.
- Michel, F., Sieg, M., Fischer, D., Keller, M., Eiden, M., Reuschel, M., Schmidt, V., Schween, R., Rinder, M., Sylvia Urbaniak, S., Müller, K., Schmook, M., Lühken, R., Wysocki, P., Fast, C., Lierz, M., Korbel, R., Vahlenkamp, T.W., Groschup, M.H., Ziegler, U., 2019. Evidence for West Nile virus and Usutu virus infections in wild and resident birds in Germany, 2017 and 2018. *Viruses* 11 (7), 674. <https://doi.org/10.3390/v11070674>.
- Murgue, B., Murri, S., Triki, H., Deubel, V., Zeller, H.G., 2001. West Nile in the Mediterranean Basin: 1950–2000. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 951, 117–126. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02690.x>.
- Nagy, A., Mezei, E., Nagy, O., Bakonyi, T., Csonka, N., Kaposi, M., Koroknai, A., Szomor, K., Rigó, Z., Molnár, Z., Dánielisz, Á., Takács, M., 2019. Extraordinary increase in West Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018. *Euro Surveill.* 24 (28) <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.28.1900038>.
- Nemeth, N., Gould, D., Bowen, R., Komar, N., 2006. Natural and experimental West Nile virus infection in five raptor species. *J. Wildl. Dis.* 42 (1), 1–13. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.1.1>.
- Nemeth, N.M., Oesterle, P.T., Bowen, R.A., 2009. Humoral immunity to West Nile virus is long-lasting and protective in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80 (5), 864–869. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.80.864>.
- Papa, A., Bakonyi, T., Xanthopoulou, K., Vázquez, A., Tenorio, A., Nowotny, N., 2011. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 17 (5), 920–922. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101759>.
- Pérez Ruiz, M., Gámez, S., Jiménez Clavero, M.Á., 2011. Infección por virus West Nile. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29 (5), 21–26. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70040-4](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70040-4).
- Pérez-Ramírez, E., Llorente, F., Jiménez-Clavero, M.Á., 2014. Experimental infections of wild birds with West Nile virus. *Viruses* 6 (2), 752–781. <https://doi.org/10.3390/v6020752>.
- Pérez-Ramírez, E., Llorente, F., del Amo, J., Nowotny, N., Jiménez-Clavero, M.Á., 2018. Susceptibility and role as competent host of the red-legged partridge after infection with lineage 1 and 2 West Nile virus isolates of Mediterranean and Central European origin. *Vet. Microbiol.* 222, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.06.012>.
- Petersen, L.R., 2019. Epidemiology of West Nile virus in the United States: implications for arbovirology and public health. *J. Med. Entomol.* 56 (6), 1456–1462. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz085>.
- Randall, N.J., Blitvich, B.J., Blanchong, J.A., 2012. Efficacy of wildlife rehabilitation centers in surveillance and monitoring of pathogen activity: A case study with West Nile virus. *J. Wildl. Dis.* 48 (3), 646–653. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.3.646>.
- Rizzoli, A., Jiménez-Clavero, M.Á., Barzon, L., Cordioli, P., Figuerola, J., Koraka, P., Martina, B., Moreno, A., Nowotny, N., Pardigon, N., Sanders, N., Ulbert, S., Tenorio, A., 2015. The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities. *Euro Surveill.* 20 (20), 21135. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.20.21135>.
- Roesch, F., Fajardo, A., Moratorio, G., Vignuzzi, M., 2019. Usutu virus: an arbovirus on the rise. *Viruses* 11 (7). <https://doi.org/10.3390/V11070640>.

- Rossi, S.L., Ross, T.M., Evans, J.D., 2010. West Nile virus. *Clin. Lab. Med.* 30 (1) <https://doi.org/10.1016/j.CLL.2009.10.006>.
- Sánchez, A., Amela, C., Santos, S., Suárez, B., Sierra, M.J., Simón, F., 2017. Informe De Situación Y Evaluación Del Riesgo De La Fiebre Por Virus Del Nilo Occidental En España. Ministerio De Sanidad, Servicios Sociales E Igualdad. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias sanitarias (CCAES), Madrid, España. <https://www.mscbs.gob.es/gl/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/infoSitua.htm>.
- Sánchez-Gómez, A., Amela, C., Fernández-Carrión, E., Martínez-Avilés, M., Sánchez-Vizcaino, J.M., Sierra-Moros, M.J., 2017. Risk mapping of West Nile virus circulation in Spain, 2015. *Acta Trop.* 169, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.022>.
- Smithburn, K.C., Hughes, T.P., Burke, A.W., Paul, J.H., 1940. A Neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20 (4), 471–492.
- Sotelo, E., Llorente, F., Rebollo, B., Camuñas, A., Venteo, A., Gallardo, C., Lubisi, A., Rodríguez, M.J., Sanz, A.J., Figuerola, J., Jiménez-Clavero, M.A., 2011. Development and evaluation of a new epitope-blocking ELISA for universal detection of antibodies to West Nile virus. *J. Virol. Methods* 174 (1–2), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.03.015>.
- Vanhomwegen, J., Beck, C., Després, P., Figuerola, A., García, R., Lecollinet, S., López-Roig, M., Manuguerra, J.C., Serra-Cobo, J., 2017. Circulation of zoonotic arboviruses in equine populations of Mallorca Island (Spain). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 17 (5), 340–346. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2042>.
- Vázquez, A., Sánchez-Seco, M.P., Ruiz, S., Molero, F., Hernández, L., Moreno, J., Magallanes, A., Tejedor, C.J., Tenorio, A., 2010. Putative new lineage of West Nile virus. *Spain. Emerg. Infect. Dis.* 16 (3), 549–552. <https://doi.org/10.3201/eid1603.091033>.
- Vázquez, A., Ruiz, S., Herrero, L., Moreno, J., Molero, F., Magallanes, A., Sánchez-Seco, M.P., Figuerola, J., Tenorio, A., 2011. West Nile and Usutu Viruses in mosquitoes in Spain, 2008–2009. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85 (1), 178–181. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0042>.
- Vidaña, B., Busquets, N., Napp, S., Elisa, P., Miguel, Á., Johnson, N., 2020. The role of birds of prey in West Nile virus epidemiology. *Vaccines* 8 (3), 550. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030550>.
- Vilibic-Cavlek, T., Savic, V., Petrovic, T., Toplak, I., Barbic, L., Petric, D., Tabain, I., Hrnjakovic-Cvjetkovic, I., Bogdanic, M., Klobucar, A., Mrzljak, A., Stevanovic, V., Dinjar-Kujundzic, P., Radmanic, L., Monaco, F., Liste, E., Savini, G., 2019a. Emerging trends in the epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in southern Europe. *Front. Vet. Sci.* 6 (437) <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00437>.
- Vilibic-Cavlek, T., Savic, V., Sabadi, D., Peric, L., Barbic, L., Klobucar, A., Miklausic, B., Tabain, I., Santini, M., Vucelja, M., Dvorski, E., Butigan, T., Kolaric-Sviben, G., Potocnik-Hunjadi, T., Balenovic, M., Bogdanic, M., Andric, Z., Stevanovic, V., Capak, K., Balicevic, M., Listes, E., Savini, G., 2019b. Prevalence and molecular epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in Croatia in the 'one health' context, 2018. *Transbound. Emerg. Dis.* 6 (5), 1946–1957. <https://doi.org/10.1111/tbed.13225>.
- Vogels, C.B.F., Göertz, G.P., Pijlman, G.P., Koenraadt, C.J.M., 2017. Vector competence of European mosquitoes for West Nile virus. *Emerg. Microbes Infect.* 6 (11), 1–13. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.82>.
- Weissenböck, H., Kolodziejek, J., Url, A., Lussy, H., Rebel-Bauder, B., Nowotny, N., 2002. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne Flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (7), 652–656. <https://doi.org/10.3201/eid0807.020094>.
- Weissenböck, H., Bakonyi, T., Rossi, G., Mani, P., Nowotny, N., 2013. Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg. Infect. Dis.* 19 (2), 274–277. <https://doi.org/10.3201/eid1902.121191>.
- Wendell, M.D., Sleeman, J.M., Kratz, G., 2002. Retrospective study of morbidity and mortality of raptors admitted to Colorado State University veterinary teaching hospital during 1995 to 1998. *J. Wildl. Dis.* 38 (1), 101–106. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-38.1.101>.
- Wilson, E.B., 1927. Probable inference, the law of succession, and statistical inference. *J. Am. Stat. Assoc.* 22 (158), 209–212. <https://doi.org/10.1080/01621459.1927.10502953>.
- Woodall, J.P., 1964. The viruses isolated from arthropods at the East African Virus Research Institute in the 26 years ending December 1963. *Proc. East. African Acad.* 2, 141–146.

6.1.3. Circulation of zoonotic flaviviruses in wild passerine birds in Western Spain

Alfonso Marzal¹, Martina Ferraguti², Jaime Muriel³, Sergio Magallanes⁴, Juan Antonio Ortiz⁵, Luz García-Longoria¹, Daniel Bravo-Barriga⁶, **Fátima Guerrero-Carvajal⁶**, Pilar Aguilera-Sepúlveda⁷, Francisco Llorente⁷, Florentino de Lope¹, Miguel Ángel Jiménez-Clavero^{7,8}, Eva Frontera⁶.

¹ Universidad de Extremadura, Facultad de Biología, Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología, Badajoz, España

²

³ Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, España

⁴ Estación Biológica de Doñana (EBD-CSIC), Departamento de Ecología de los Humedales

⁵ Grupo Hirundo de Anillado de Aves, Badajoz, España

⁶ Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura (Uex), Cáceres, España

⁷ Centro de Investigación de Sanidad Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA-CISA), Valdeolmos, Madrid, España

⁸ Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, España

Veterinary Microbiology 2022 268:109399

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109399>

Factor de impacto, cuartil y categoría: 3.246/Q1/VETERINARY SCIENCES

Posición categoría: 15/145

Artículo publicado online en acceso abierto

Resumen

El virus del Nilo occidental (VNO) es un flavivirus en cuyo ciclo epidemiológico las aves actúan como hospedadores y reservorio principal del virus, especialmente las aves migratorias. Los seres humanos y los caballos son susceptibles de infectarse también, pero no pueden transmitir el virus a otros vectores, ya que la viremia es corta y la titulación de anticuerpos que pueden alcanzar también es baja, por lo que actúan como fondos de saco epidemiológico. En estudios anteriores en el oeste de España se han realizado estudios de seroprevalencia en aves silvestres enfermas sintomáticas y en caballos. Sin embargo, no se habían realizado estudios en poblaciones de aves silvestres sanas y asintomáticas, provocando una pérdida muy valiosa de información de lo que ocurre en estos hospedadores amplificadores del VNO. Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue conocer el posible contacto de estas aves con el virus en la región extremeña, mediante la toma de muestras en especies de aves silvestres sanas del Orden Paseriformes, aprovechando la época de anillado de las mismas. Se analizaron un total de 645 ejemplares de 14 familias y unas 20 especies diferentes, en zonas preferentemente periurbanas.

Las muestras se tomaron entre diciembre de 2018 y octubre de 2019, recogiendo 40 µl de sangre de la vena yugular. Las muestras de sangre se centrifugaron a 11.000 rpm durante 10 min a 4 °C dentro de las siguientes 24 h después de la recolección, para separar el suero, que se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis. Para detectar la presencia de anticuerpos específicos en suero frente al VNO, se realizó la prueba ELISA (kit INGEZIM West Nile COMPAC COMPAC, Ingenasa, España), confirmándose a continuación mediante micro-VNT frente a 2 flavivirus; el VNO (VNO E101, GenBank nº de acceso AF260968), el VUSU (VUSU SAAR-1776, GenBank nº de acceso AY453412).

De las 645 muestras, 75 (11,6%) fueron positivas a ELISA, mientras que 51 (7,9%) fueron dudosas. Como limitación de nuestro estudio cabe destacar el reducido volumen de las muestras de sangre disponible, debido al pequeño tamaño de las aves, por lo que tan solo se pudieron someter a la prueba de VNT 104 de los 126 sueros que fueron positivos/dudosos por ELISA. De esos 104 sueros, se pudieron confirmar por VNT 20 positivos a VNO (19,23%) y uno a VUSU (0,96%). Sin embargo, 61 muestras fueron clasificadas como positivas a flavivirus indeterminado. Del total de las muestras positivas por VNT, 48 lo fueron en especies exóticas, 30 en aves migratorias nativas y 4 en residentes, sin encontrar diferencias significativas entre ellas. Este trabajo permitió detectar por primera vez en Europa la presencia de anticuerpos específicos frente al VNO en el bengalí rojo (*Amandava amandava*) y el ruiseñor bastardo (*Cettia cetti*) y anticuerpos específicos frente al VUSU en el obispo corniculado (*Euplectes afer*). No se encontraron diferencias en la exposición entre las aves exóticas residentes, nativas exóticas y nativas residentes.

La presencia tanto de VNO como de VUSU en especies residentes e individuos migratorios jóvenes antes de su primera migración, demuestra su circulación generalizada en las poblaciones de Paseriformes del sur de Europa durante todo el año, con las implicaciones que ello supone tanto para la Salud Pública como para la Sanidad Animal. Serían necesarios más estudios para caracterizar los linajes de ambos virus presentes en estas aves y para determinar su origen potencial, patogenicidad y el riesgo. Esta circulación, junto con la densidad, la proximidad a ambientes antropogénicos y la frecuencia de contacto con humanos de los paseriformes enfatizan la importancia de incluir estas especies silvestres en los programas de vigilancia como posibles reservorios de estos arbovirus.



Short communication

Circulation of zoonotic flaviviruses in wild passerine birds in Western Spain

A. Marzal^{a,*}, M. Ferraguti^{b,1}, J. Muriel^c, S. Magallanes^d, J.A. Ortiz^e, L. García-Longoria^a, D. Bravo-Barriga^f, F. Guerrero-Carvajal^f, P. Aguilera-Sepúlveda^g, F. Llorente^g, F. de Lope^a, M.Á. Jiménez-Clavero^{g,h}, E. Frontera^f

^a Universidad de Extremadura, Facultad de Biología, Departamento de Anatomía, Biología celular y Zoología, Avenida de Elvas s/n, 06006 Badajoz, España

^b Department of Theoretical and Computational Ecology (TCE), Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics (IBED), University of Amsterdam, Science Park 904, 1098XH Amsterdam, The Netherlands

^c Department of Zoology, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain

^d Estación Biológica de Doñana (EBD-CSIC), Departamento de Ecología de los Humedales, Avda. Américo Vespucio 26, 41092 Sevilla, España

^e Hirundo Bird Ringing Group, Badajoz, España

^f Universidad de Extremadura, Facultad de Veterinaria, Departamento de Sanidad Animal, Parasitología, Avda. Universidad s/n, 10003 Cáceres, España

^g Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA), Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CSIC), 28130 Valdeolmos, Madrid, España

^h Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, España

ARTICLE INFO

Keywords:

Avian reservoir hosts
Arboviruses
Public health
Usutu virus
West Nile virus

ABSTRACT

We explore the presence of zoonotic flaviviruses (West Nile virus (WNV) and Usutu virus (USUV)) neutralizing antibodies in rarely studied passerine bird species. We report, for the first time in Europe, WNV-specific antibodies in red avadavat and cetti's warbler, and USUV in yellow-crowned bishop. The evidence of WNV and USUV circulating in resident and migratory species has implications for both animal and public health. Future outbreaks in avian reservoir hosts may occur and passerines should be considered as priority target species in flavivirus surveillance programmes.

1. Introduction

Emerging and re-emerging infectious diseases represent a major threat to biodiversity and an important public health issue. West Nile virus (WNV) and Usutu virus (USUV) are closely related emerging vector-borne zoonotic arboviruses (Fam. Flaviviridae) co-circulating in many areas (Nikolay, 2015), and they are currently broadening their incidence and distribution in Europe (Bakonyi and Haussig, 2020; Vilibic-Cavlek et al., 2020). Indeed, West Nile fever is one of the most widespread viral diseases on the planet (Chancey et al., 2015) and a re-emerging viral disease in Spain (Sotelo et al., 2011), with a complex eco-epidemiology as it has been reported in more than 300 bird species (CDC C for DC and P., 2021). The recent unprecedented outbreaks accompanied with growing cases of human morbidity and mortality during last decade has prompted zoonotic flaviviruses as a major public health concern (Rodríguez-Alarcón et al., 2021; World Health Organization, 2022).

Both WNV and USUV are largely maintained in a mosquito-bird

transmission cycle, with humans and other mammals considered as incidental ("dead-end") hosts. Therefore, avian species are key vertebrate reservoir hosts for zoonotic flavivirus studies. Although their re-emergence in Europe in early 2000's led to an intensified surveillance for infection in birds, some important gaps, such as the reservoir competence for many European avian species, remain unsolved (Rizzoli et al., 2015). Indeed, to minimise zoonotic outbreaks, it is essential to know the natural reservoirs that are involved in their emergence, amplification or dilution. In Europe, large bird species such as raptors are usually found affected in WNV outbreaks, representing a well-studied group in WNV seasonal circulation and introduction (Vidaña et al., 2020; Bravo-Barriga et al., 2021), although their role in maintaining an enzootic cycle is still unclear. This could be probably due to most of the WNV observations are by passive surveillance (e.g., carcass sampling) and from birds in recovery centres (Vidaña et al., 2020; Bravo-Barriga et al., 2021). However, the role of other bird species such as small passerines in local flaviviruses circulation has been ignored or underestimated in many WNV surveillance studies occurring

* Corresponding author.

E-mail address: amarzal@unex.es (A. Marzal).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109399>

Received 2 February 2022; Received in revised form 14 March 2022; Accepted 19 March 2022

Available online 22 March 2022

0378-1135/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

in Europe. This is remarkable since passerines are the most diverse and abundant avian species in the world (Del Hoyo and Collar, 2016). Moreover, their presence in agricultural and urban environments may boost the risk and emergence of zoonotic diseases in humans (Gibb et al., 2020), thus constituting a research priority to detect possible introduction and spread of zoonotic viruses. Although the role of certain passerines species in WNV transmission is well known in other countries (particularly in USA), the role of small passerines as WNV and USUV reservoir and potential amplifying hosts of infection is less known in Europe. Many recent studies have explored WNV and USUV in poultry, dead wild birds or those admitted to wildlife rehabilitation centres, revealing a widespread circulation of flaviviruses among these birds (Folly et al., 2020; Bravo-Barriga et al., 2021; Napp et al., 2021). Nonetheless, asymptomatic individuals in wild populations are under-sampled, and this could lead to missing important information to assess local circulation of flavivirus in avian communities, and to failing to detect new target species for wild bird disease surveillance. For example, the extensive capturing and sampling of wild birds in the Netherlands has allowed the recent report of the first locally acquired WNV detection in birds, thus revealing the potential role of this passerine species in enzootic transmission (Sikkema et al., 2020). Furthermore, because their ability to survive WNV infection and to develop detectable antibodies to WNV, exotic birds are considered as suitable species for conducting serosurveillance for this flavivirus (Hofmeister et al., 2015). Moreover, the role of migratory birds in the maintenance and worldwide dissemination of zoonotic pathogens such as flaviviruses would be also very valuable for public health risk assessment (Malik et al., 2021).

2. Methodology of study

We explore the prevalence of flavivirus (WNV and USUV) in 645 free-living individuals from 20 species and 14 families frequently found in human dominated landscapes. Birds were captured using mist nets in

December 2018 and from January to October 2019 in four sampling areas in Extremadura, southwestern Spain (Azud de Badajoz: 38°51'0.5" N, 7°1'19.8" W; Casas Aisladas de Gévora: 38°55'55.9" N, 6°57'44" W; Sagrajas: 38°55'42.7" N, 6°53'48.9" W; Botoa: 38°53'10.3" N, 6°55'32.5" W. Fig. 1), a region with active flavivirus circulation (Guerrero-Carvajal et al., 2021). We classified as exotic species to invasive species that were introduced with human assistance outside their native range. Migratory species were categorized to those flying over long distances to spend the winter in different habitats, whereas resident species spend the whole year in their breeding grounds. Blood samples (c.a. 40 µl) were collected from the jugular vein of 45 native resident (10 species), 339 exotic resident (3 species) and 261 native migratory individuals (7 species) (Table 1). All native birds were released after blood sampling. According to Spanish laws, exotic species were delivered to authorities. Blood samples were kept at 4 °C and centrifuged within 24 h after sampling for 10 min at 11,000 rpm to separate the plasma, which was stored at -80 °C until further analysis.

All serum samples were analysed by the blocking ELISA kit INGEZIM West Nile COMPAC (Ingenasa, Spain). This test detects WNV antibodies, but it partially cross-reacts with other flaviviruses (Llorente et al., 2019), allowing the detection of USUV antibodies. The inhibition percentage (IP) of each sample was calculated following the manufacturer's protocol. Serum samples with IP equal to or higher than 40% were considered as positive; samples with IP equal to or lower than 30% were considered as negative. IP values between 30% and 40% were doubtful. Because flaviviruses within the same serocomplex (e.g., WNV and USUV) exhibit strong cross-reactions in serological tests, ELISA positive and doubtful samples were subsequently analysed by confirmatory micro virus-neutralization test (micro-VNT) against WNV (WNV E101, GenBank accession no. AF260968) and USUV (viral strain: USUV SAAR-1776, GenBank accession no. AY453412) for differential diagnosis, as described previously (Llorente et al., 2019). The detection of neutralizing antibody titres at least 4-fold higher for a given flavivirus

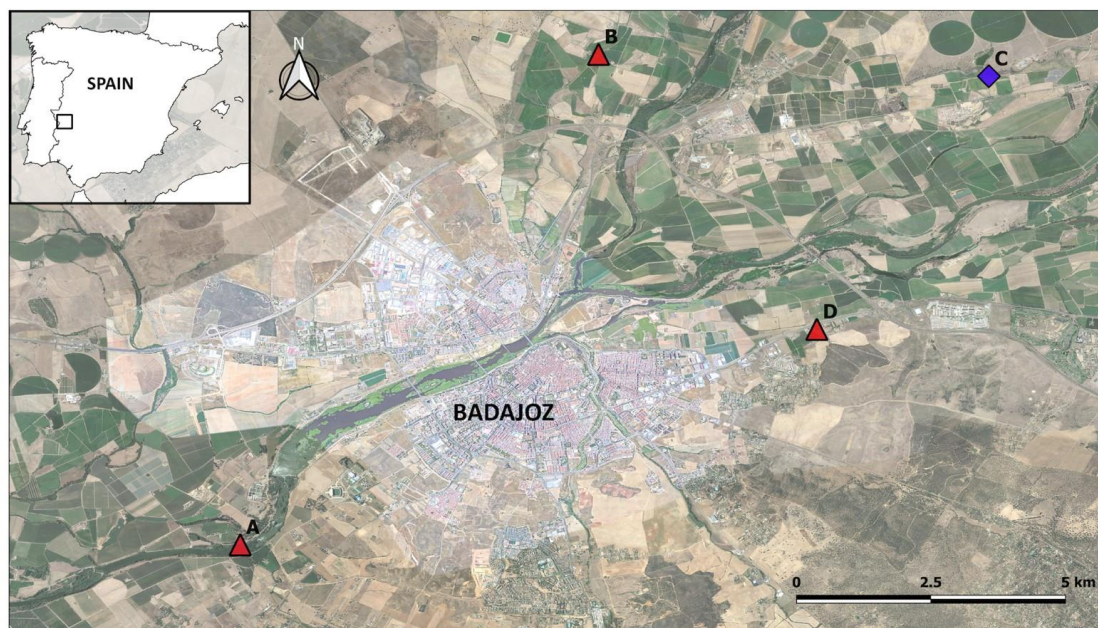


Fig. 1. Geographical distribution and positive VNT-results for WNV (red triangle), USUV (blue diamonds) in wild birds during 2018 and 2019 in Extremadura, southwestern Spain. Undetermined Flavivirus were found in all sampled localities (A: Azud de Badajoz; B: Casas Aisladas de Gévora; C: Sagrajas; D: Botoa). Map created by QGIS Geographic Information System, version 3.22.0 (2021). QGIS Association, <http://www.qgis.org>.

Table 1

Results obtained from ELISA and micro-VNT test for WNV and USUV in wild birds from Extremadura, southwestern Spain.

Family	Species name	Common name	Status	Sampling locality	N	Elisa positive (doubtful)	VNT analyzed	VNT positive WNV specific	VNT positive USUV specific	VNT positive Undetermined Flavivirus
Estrildidae	<i>Amandava amandava</i>	Red avadavat	Exotic resident	B, C	120	3 (6)	4	1	0	3
Estrildidae	<i>Estrilda astrild</i>	Common waxbill	Exotic resident	A, B, C	130	18 (22)	31	0	0	31
Ploceidae	<i>Euplectes afer</i>	Yellow-crowned bishop	Exotic resident	B, C	89	13 (6)	15	0	1	12
Hirundinidae	<i>Delichon urbicum</i>	House martin	Native migratory (S)	D	232	37 (13)	48	18	0	12
Motacillidae	<i>Anthus pratensis</i>	Meadow pipit	Native migratory (W)	A	1	0	0	0	0	0
Muscicapidae	<i>Erithacus rubecula</i>	European robin	Native migratory (W)	A	5	1 (1)	2	0	0	0
Muscicapidae	<i>Ficedula hypoleuca</i>	European pied flycatcher	Native migratory (P)	A	3	0	0	0	0	0
Muscicapidae	<i>Luscinia megarhynchos</i>	Common nightingale	Native migratory (S)	A	1	0	0	0	0	0
Phylloscopidae	<i>Phylloscopus collybita</i>	Common chiffchaff	Native migratory (W)	A, C	18	0 (1)	0	0	0	0
Turdidae	<i>Turdus philomelos</i>	Song thrush	Native migratory (W)	A	1	0	0	0	0	0
Alcedinidae	<i>Alcedo atthis</i>	Common kingfisher	Native resident	A	4	0	0	0	0	0
Aegithalidae	<i>Aegithatus caudatus</i>	Long-tailed tit	Native resident	A	4	0	0	0	0	0
Cettiidae	<i>Cettia cetti</i>	Cetti's warbler	Native resident	A	9	1	1	1	0	0
Fringillidae	<i>Serinus serinus</i>	European serin	Native resident	A	1	0	0	0	0	0
Paridae	<i>Cyanistes caeruleus</i>	Eurasian blue tit	Native resident	A	6	0	0	0	0	0
Paridae	<i>Parus major</i>	Great tit	Native resident	A	1	0	0	0	0	0
Passeridae	<i>Passer domesticus</i>	House sparrow	Native resident	C	1	1	1	0	0	1
Passeridae	<i>Passer hispaniolensis</i>	Spanish sparrow	Native resident	A	8	0	0	0	0	0
Sylviidae	<i>Sylvia atricapilla</i>	Eurasian blackcap	Native resident	A	2	0	0	0	0	0
Sylviidae	<i>Sylvia melanocephala</i>	Sardinian warbler	Native resident	A, C	9	1 (2)	2	0	0	2
					645	75 (51)	104 *	20	1	61

Note: In bold, species that have been detected with specific WNV and USUV antibodies for first time in Europe. * Because the limited amount of collected plasma, only 104 ELISA samples were analysed in parallel by micro-VNT against WNV and USUV. Sampling localities (A: Azud de Badajoz; B: Casas Aisladas de Gévora; C: Sagrajas; D: Botoa). Native migratory bird species were categorized as wintering (W), passage migrants (P) and bird species breeding in Spain during spring (S).

over the other was considered a proof of specificity (Calisher et al., 1989). When VNT titre differences did not reach this threshold, the result was considered inconclusive and the specific flavivirus causing the infection could not be determined.

We performed Chi-square test to determine if the proportion of individuals exposed to WNV or USUV varied with bird status (exotic resident, native migratory, native resident). All analyses were performed using PASW Statistics 18 statistical package for Windows.

3. Results

Overall, out of 645 samples, 75 (11.6%) specimens tested positive by ELISA, whereas 51 (7.9%) were doubtful. Due to the limitations of working with small birds and the limited amount of collected plasma, only 104 ELISA samples (71 positive and 33 doubtful) out of the 126

positive and doubtful samples were subsequently analysed in parallel by micro-VNT against WNV and USUV. Outcomes from VNT analyses revealed that 20 birds (19.23% of the samples analysed by VNT) showed specific antibodies for WNV, one for USUV (0.96%), and 61 (58.65%) were classified as undetermined flavivirus being not possible to determine the specificity of antibodies in these samples (Table 1). The remaining 22 samples (21.16%) tested by VNT were negative.

A total of 82 samples (48 exotic resident, 30 native migratory and 4 native resident) were confirmed by VNT to be exposed to WNV or USUV (Table 1). There were no differences in the proportion of individuals exposed to WNV or USUV depending on their bird status (exotic resident = 14.95%, native migratory = 11.63%, native resident = 9.09%; Chi-square test: $N = 623$; $\chi^2 = 2.070$; g.l. = 2; $p = 0.3515$).

4. Discussion

This is the first WNV and USUV study carried out on free-range wild birds from Extremadura on their natural habitats. We confirmed flavivirus' exposure in 82 birds (12.7%), highlighting the importance of passerines for the correct assessment of circulation in the region. Notably, our findings in wild populations of passerines are similar to those recently reported by Napp et al. (2021) showing a 10% of seroprevalence of flaviviruses in poultry and wild birds from northeast Spain. In addition, a survey carried out mainly in larger birds (e.g., Pelecaniformes and Ciconiiformes) admitted to rehabilitation centres in Extremadura showed a higher flavivirus seroprevalence compared to our study (Bravo-Barriga et al., 2021), which could be explained because the expected higher number of cases of infectious diseases in birds arriving at rehabilitation centres (Camacho et al., 2016). However, we should be cautious with our records because the use of passive methods for bird capturing such as mist nets or traps may produce biased data about the number of infected birds in one population, given that the mortality and reduced activity of individuals infected with flavivirus (Hubálek et al., 2014) could reduce the capture probabilities among these birds. Moreover, working with passerines had important limitations; for instance, the volume of plasma is usually very scarce, thus, 22 positive and doubtful ELISA samples were excluded from the VNT analyses possibly underestimating the number of birds infected with flavivirus in the studied wild populations.

Overall, 48 exotic resident, 30 native migratory and 4 native resident individuals were confirmed as infected by flaviviruses by VNT. Specifically, all the exotic resident bird species showed antibodies for undetermined flavivirus. In addition, one juvenile red avadavat (*Amandava amandava*) captured in January 2019 showed specific antibodies for WNV and one adult yellow-crowned bishop (*Euplectes afer*) sampled in December 2018 for USUV. Because red avadavat normally reproduce during the last months of the year in Spain (De Lope et al., 1985), the presence of antibodies against WNV in young individuals suggests an active circulation of flavivirus during autumn or early winter in our latitudes. Among the native migratory bird species, only house martins (*Delichon urbicum*) were confirmed as infected with undetermined flaviviruses ($n = 12$), and 18 birds captured in June 2019 showed antibodies for WNV. This high number of VNT-positive for WNV in house martins is particularly relevant, especially in the context that some WNV strains could have been introduced from Africa to Europe by migratory birds (García-Carrasco et al., 2021). Moreover, one out of the 18 VNT-positive for WNV house martins was a juvenile bird sampled prior to its first migration to Africa, confirming the circulation of the virus in the area in late winter – spring 2019 and supporting a potential role of this migratory species in the active circulation of WNV in Europe. Finally, three native resident bird species were infected by flaviviruses, with one adult cetti's warbler (*Cettia cetti*) sampled in October 2019 showing specific antibodies for WNV, and one house sparrow (*Passer domesticus*) and two sardinian warbler (*Sylvia melanocephala*) infected by undetermined flaviviruses.

The presence of antibodies to WNV and USUV in resident species and migratory individuals prior its first migration demonstrates the widespread circulation of these flaviviruses in passerine populations in south Europe across all the year. This outcome, together with the density, proximity to anthropogenic environments and contact frequency with humans of passerines, stress the importance to include these wild species in the routine surveillance programmes for zoonotic diseases. Remarkably, WNV-specific antibodies were found in red avadavat and cetti's warbler for the first time in Europe, while a seropositive house martin was already found in the studied area (Bravo-Barriga et al., 2021). In addition, USUV was reported for the first time in Europe in a yellow-crowned bishop (see Vojtšek et al., 2021 for a recent review). Further studies would be needed to characterize the WNV and USUV strains present in these birds and to determine their potential origin, pathogenicity and the risk to public health.

Ethical issues

Bird trapping was carried out with all necessary permits with the current regional and national laws of Spain, and sampling on private land and residential areas were conducted with all the necessary permits and consent from the owners. Methods were evaluated and approved by the institutional Commission of Bioethics of University of Extremadura (CBUE 49/2019) and by Junta de Extremadura Local Government (87/2019).

Authors' contributions

AM and MF conceived the idea of the study; AM, MF, SM, JM, LGL and JAO collected the samples; DB-B, FG-C performed the ELISA assays; JM, PA-S and FL performed the VNT analyses. DB-B carried out the editing and visualization of geographical data. AM and MF wrote the first draft of the manuscript; AM, FdL, EF and MAJ-C contributed to the reagents/materials/analysis tools. All authors read, contributed to, and approved, the final version of the manuscript.

Funding

This work was funded by Consejería de Economía e Infraestructura of the Junta de Extremadura and the European Regional Development Fund, a Way to Make Europe, through the research project (grant numbers IB20089 and IB16135), and PR (19_ECO_0070) project *Aves y Enfermedades Infecciosas Emergentes: Impacto de las Especies Exóticas y Migratorias en la transmisión de Malaria aviar y el virus del Nilo Occidental - AvEIEs* from Ayudas Fundación BBVA a Equipos de Investigación Científica 2019. CISA (INIA-CSIC) was funded by INIA projects number E-RTA2015-00002-CO2-01 and AEI PID2020-116768RR-C21. MF was supported by a Juan de la Cierva 2017 Formación contract (FJCI-2017-34394) from the Ministry of Science, Innovation and Universities, and she is currently funded by the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie (grant agreement No 844285, 'EpiEcoMod'). JM was supported by a postdoctoral grant from the Juan de la Cierva Subprogram (FJCI-2017-34109), with the financial sponsorship of the MICINN. FG-C is supported by Ayudas a la Formación Investigador Predoctoral 2018 (PD18056) from the Extremadura Government. PA-S is supported by an FPI-SGIT predoctoral contract from INIA/CISA.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data Accessibility

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgements

We are grateful to Cosme Lopez-Calderón, Daniel Parejo, Gonzalo Cidoncha, Josué Martínez-de la Puente, Maribel Reviriego, Manuel González, Sonia Cebrián for their help during the house martin field-work, and to Elisa Pérez-Ramírez for her assistance in the laboratory.

References

- Bakonyi, T., Haussig, J.M., 2020. West Nile virus keeps on moving up in Europe. *Eurosurveillance* 25 (46), 2001938. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.46.2001938>.
- Bravo-Barriga, D., Aguilera-Sepúlveda, P., Guerrero-Carvajal, F., Llorente, F., Reina, D., Pérez-Martín, J.E., Jiménez-Clavero, M.A., Frontera, E., 2021. West Nile and Usutu

- virus infections in wild birds admitted to rehabilitation centres in Extremadura, western Spain, 2017–2019. *Vet. Microbiol.* 255, 109020 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109020>.
- Camacho, M., Hernández, J.M., Lima-Barbero, J.F., Höfle, U., 2016. Use of wildlife rehabilitation centres in pathogen surveillance: A case study in white storks (*Ciconia ciconia*). *Prev. Vet. Med.* 130, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.06.012>.
- CDC C for DC and P, 2021. List of all bird species in which West Nile virus has been detected. Available: (<https://www.cdc.gov/westnile/dead-birds/index.html>).
- Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E., Rios, M., 2015. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed. Res. Int.* 2015, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/376230>.
- De Lope, F., Guerrero, J., De la Cruz, C., Da Silva, E., 1985. Quelques aspects de la biologie du Bengali Rouge (*Amandava amandava* L.) dans le bassin du Gadiana (Extremadure, Espagne). *Alauda* 53, 166–180.
- Del Hoyo, J., Collar, N.J., 2016. Illustrated checklist of the birds of the world. HBW and BirdLife International. Barcelona, Spain and Cambridge, UK: Lynx Editions in association with BirdLife International; Available: (<http://www.lynxeds.com/product/hbw-and-birdlife-international-illustrated-checklist-birds-world>).
- Folly, A.J., Lawson, B., Lean, F.Z., McCracken, F., Spiro, S., John, S.K., Heaver, J.P., Seilern-Moy, K., Masters, N., Hernández-Triana, L.M., Phipps, L.P., Nuñez, A., Fooks, A.R., Cunningham, A.A., Johnson, N., McElhinney, L.M., 2020. Detection of Usutu virus infection in wild birds in the United Kingdom, 2020. *Eurosurveillance* 25 (41), 2001732. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.41.2001732>.
- García-Carrasco, J.M., Muñoz, A.R., Olivero, J., Segura, M., Real, R., 2021. Predicting the spatio-temporal spread of West Nile virus in Europe. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 15 (1), e0009022 <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0009022>.
- Gibb, R., Redding, D.W., Chin, K.Q., Donnelly, C.A., Blackburn, T.M., Newbold, T., Jones, K.E., 2020. Zoonotic host diversity increases in human-dominated ecosystems. *Nature* 584 (7821), 398–402. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2562-8>.
- Guerrero-Carvajal, F., Bravo-Barriga, D., Martín-Cuervo, M., Aguilera-Sepúlveda, P., Ferraguti, M., Jiménez-Clavero, M.Á., Lorente, F., Alonso, J.M., Frontera, E., 2021. Serological evidence of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids from western Spain. *Transbound. Emerg. Dis* 68 (3), 1432–1444. <https://doi.org/10.1111/tbed.13810>.
- Hofmeister, E.K., Dusek, R.J., Brand, C.J., 2015. Surveillance Potential of Non-Native Hawaiian Birds for Detection of West Nile Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 93 (4), 701–708. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0590>.
- Hubálek, Z., Rudolf, I., Nowotny, N., 2014. Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. *Adv. Virus Res.* 89, 201–275. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800172-1.00005-7>.
- Llorente, F., García-Irazábal, A., Pérez-Ramírez, E., Cano-Gómez, C., Sarasa, M., Vázquez, A., Jiménez-Clavero, M.Á., 2019. Influence of flavivirus co-circulation in serological diagnostics and surveillance: A model of study using West Nile, Usutu and Bagaza viruses. *Transbound. Emerg. Dis* 66 (5), 2100–2106. <https://doi.org/10.1111/TBED.13262>.
- Malik, Y.S., Milton, A.A.P., Ghatak, S., Ghosh, S., 2021. Role of Birds in Transmitting Zoonotic Pathogens, 39–56. Springer Nature, Singapore, pp. 15–24. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-4554-9>.
- Napp, S., Llorente, F., Beck, C., Jose-Cunilleras, E., Soler, M., Paillet-García, L., Amaral, R., Aguilera-Sepúlveda, P., Pifarré, M., Molina-López, R., Obón, E., Nicolás, O., Lecollinet, S., Jiménez-Clavero, M.Á., Busquets, N., 2021. Widespread Circulation of Flaviviruses in Horses and Birds in Northeastern Spain (Catalonia) between 2010 and 2019. *Viruses* 13 (12), 2404. <https://doi.org/10.3390/V13122404>.
- Nikolay, B., 2015. A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: how much do transmission cycles overlap? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 109 (10), 609–618. <https://doi.org/10.1093/TRSTMH/TRV066>.
- Rizzoli, A., Jimenez-Clavero, M.Á., Barzon, L., Cordioli, P., Figuerola, J., Koraka, P., Martina, B., Moreno, A., Nowotny, N., Pardigon, N., Sanders, S., Ulbert, S., Tenorio, A., 2015. The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities. *Eurosurveillance* 20 (20), 21135. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.20.21135>.
- Rodríguez-Alarcón, L.G.S.M., Fernández-Martínez, B., Moros, M.J.S., Vázquez, A., Pachés, P.J., Villaceros, E.G., Gómez-Martín, M.B., Figuerola, J., Lorusso, N., Ramos Aceitero, J.M., Moro, E., de Celis, A., Oyonarte, S., Mahillo, B., Romero-González, L. J., Sánchez-Seco, M.P., Suárez-Rodríguez, B., Ameyugo, U., Ruiz-Contreras, S., Pérez-Olmeda, M., Soria, F., 2021. Unprecedented increase of West Nile virus neuroinvasive disease, Spain, summer 2020. *Eurosurveillance* 26 (19), 2002010. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.19.2002010>.
- Sikkema, R.S., Schrama, M., Van Den Berg, T., Morren, J., Munger, E., Krol, L., van der Beek, J.G., Blom, R., Chestakova, I., van der Linden, A., Boter, M., van Mastrigt, T., Molenkamp, R., Koenraadt, C.J., van den Brand, J.M., Oude Munnink, B.B., Koopmans, M.P., van der Jeugd, H., 2020. Detection of West Nile virus in a common whitethroat (*Curruca communis*) and *Culex* mosquitoes in the Netherlands, 2020. *Eurosurveillance* 25 (40), 2001704. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.40.2001704>.
- Sotelo, E., Fernandez-Pinero, J., Jiménez-Clavero, M.Á., 2011. West Nile fever/encephalitis: re-emergence in Europe and the situation in Spain. *Infect. Immun.* 79 (2), 75–83. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2011.09.002>.
- Vidaña, B., Busquets, N., Napp, S., Pérez-Ramírez, E., Jiménez-Clavero, M.Á., Johnson, N., 2020. The role of birds of prey in West Nile virus epidemiology. *Vaccines* 8 (3), 550. <https://doi.org/10.3390/VACCINES8030550>.
- Vilibic-Cavlek, T., Petrovic, T., Savic, V., Barbic, L., Tabain, I., Stevanovic, V., Klobucar, A., Mrzljak, A., Ilic, M., Bogdanic, M., Benvin, I., Santini, M., Capak, K., Monaco, F., Listes, E., Savini, G., 2020. Epidemiology of Usutu Virus: The European Scenario. *Pathogens* 9 (9), 699. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9090699>.
- Vojtisek, J., Pečta, R., Kejková, R., Hubálek, Z., Šikutová, S., Rudolf, I., 2021. Usutu virus, another emerging mosquito-borne pathogen in central Europe. *Mil. Med. Sci. Lett.* 90, 1–14. <https://doi.org/10.31482/MMSL.2021.031>.
- World Health Organization, 2022. Vector-Borne Diseases. Available online: (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>) (accessed on 5th January 2022).

6.1.4. Identification of Usutu Virus Africa 3 lineage in a survey of mosquitoes and birds from urban areas Western Spain

Daniel Bravo-Barriga^{1,2}, Martina Ferraguti^{2,3*}, Sergio Magallanes^{2,4}, Pilar Aguilera-Sepúlveda⁵, Francisco Llorente⁵, Elisa Pérez-Ramírez⁵, Ana Vázquez^{6,7}, **Fátima Guerrero-Carvajal**¹, María Paz Sánchez-Seco^{6,9}, Miguel Ángel Jiménez-Clavero^{5,7}, Carlos Mora-Rubio², Alfonso Marzal^{2,8}, Eva Frontera¹, Florentino de Lope².

¹ Universidad de Extremadura, Facultad de Veterinaria, Departamento de Sanidad Animal, Parasitología, Avda. Universidad s/n, 10003 Cáceres, España

² Universidad de Extremadura, Facultad de Biología, Departamento de Anatomía, Biología celular y Zoología, Avenida de Elvas s/n, 06006 Badajoz, España.

³ University of Amsterdam, Department of Theoretical and Computational Ecology (TCE), Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics (IBED), Science Park 904, 1098XH Amsterdam, The Netherlands

⁴ Estación Biológica de Doñana, (EBD-CSIC), Departamento de Ecología de los Humedales, Avda. Américo Vespucio 26, 41092 Sevilla, España

⁵ Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), CSIC, 28130 Valdeolmos, España

⁶ Laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Víricas Importadas. CNM-Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, España

⁷ Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, España

⁸ Grupo de Investigación y Sostenibilidad Ambiental. Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima, Perú

⁹ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Madrid, España

Transboundary and Emerging Diseases, 2023; 6893677

DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/6893677>

Factor de impacto, cuartil y categoría: 4.521/Q1/Veterinary sciences
Posición categoría: 7/145

Artículo publicado online en acceso abierto

Resumen

El virus Usutu (VUSU) es un arbovirus zoonótico emergente, con un incremento en el número de casos tanto en animales como en seres humanos en los últimos años en Europa y, por ende, en España. Para poder anticiparnos a los brotes causados por estos flavivirus, resulta fundamental conocer tanto las especies de vectores como los hospedadores aviares que están actuando en el ciclo epidemiológico del mismo. Se han llevado a cabo numerosos estudios de seroprevalencia, tanto en aves como en caballos, así como algunos estudios de vigilancia entomológica en los que se ha detectado el linaje África 2 del VUSU en mosquitos *Culex pipiens* y *Culex perexiguus* en Cataluña y en Andalucía, respectivamente. Sin embargo, la mayor parte de los estudios sobre flavivirus siguen centrándose solo en el VNO, dejando fuera de foco al VUSU, con quien comparte importantes características en cuanto a hospedadores, sintomatología, ciclo y modo de transmisión. Tal es así, que los hallazgos de detección del VUSU suelen ser colaterales a los estudios de VNO, al existir una importante reacción cruzada en los métodos de diagnóstico más utilizados para su detección.

Por lo tanto, combinar en los programas de vigilancia entomológica ambos flavivirus ofrece importantes beneficios y contribuye a mejorar nuestro conocimiento sobre su epidemiología y las interacciones potenciales que podrían afectar en la transmisión de ambos patógenos en condiciones naturales. El objetivo principal de este trabajo fue analizar la posible circulación del VUSU tanto en mosquitos y aves de las mismas áreas de zonas periurbanas de Extremadura. Esto permitiría confirmar la presencia de un ciclo endémico de este patógeno en los mismos hábitats y ecosistemas de ambos hospedadores.

Se seleccionaron cinco áreas de muestreo en Extremadura, con hábitats adecuados para mosquitos y aves silvestres. Los mosquitos se capturaron desde mayo hasta noviembre de 2020, mientras que las muestras de sangre de aves se tomaron de febrero a diciembre de 2020, y de marzo a mayo de 2021. La presencia del genoma del VUSU en los mosquitos se evaluó mediante una tríplex PCR-RTr, la cual permite detectar y diferenciar el VNO-Linaje1, el VNO-Linaje2 y el VUSU. Para la caracterización de los grupos positivos al VUSU, se utilizaron dos PCR genéricas anidadas para detectar el genoma de flavivirus localizado en la región del gen NS5. En el caso de las aves, las muestras de suero se procesaron mediante un kit ELISA de bloqueo (INGEZIM West Nile COMPAC, Ingensa, España) para la detección de anticuerpos específicos frente al VNO, siendo confirmados los resultados positivos/dudosos mediante micro-VNT contra el VNO (VNO E101, GenBank nº de acceso AF260968), el VUSU (VUSU SAAR-1776, GenBank nº de acceso AY453412) y VBAG (VBAG GenBank, nº de acceso KR108244).

En total fueron capturados 5991 mosquitos, de 13 especies diferentes, incluyendo aquellos que son conocidos como vectores más importantes de flavivirus (*Cx. pipiens*, *Cx. perexiguus* y *Culex univittatus*). Estos fueron agrupados en grupos en función de la

especie, fecha de captura y trampa en un total de 433 grupos de mosquitos, de los cuales en dos grupos de mosquitos de *Cx. pipiens* se detectó el VUSU. Se realizaron dos análisis filogenéticos sobre la base de fragmentos de los nucleótidos 1030 y 238 del gen NS5 utilizando el método de Máxima Verosimilitud (ML). El análisis filogenético mostró que la secuencia obtenida se agrupó con otras secuencias pertenecientes al linaje África 3 del VUSU, previamente detectado en África y varios países europeos. De hecho, la secuencia obtenida en los *Cx. pipiens* de Extremadura difiere de secuencias españolas anteriores obtenidas de mosquitos capturados en Cataluña y Andalucía (en 2006 y 2009 de *Cx. pipiens* y *Cx. perexiguus*, respectivamente).

En cuanto a las aves, de las 1413 aves analizadas, se encontraron anticuerpos específicos para el VUSU en 17 individuos (1,2%; 10 machos y 7 hembras) de ocho especies diferentes, en tres de ellas se ha detectado por primera vez, *Lanius senator*, *Luscinia megarhynchos* y *Amandava amandava*. La mayoría de las aves seropositivas fueron adultas, salvo cuatro individuos, dos rabilargos asiáticos (*Cyanopica cyanus*), un bengalí rojo (*A. amandava*) y un carbonero común (*Parus major*).

Se trata de la primera detección del linaje África 3 del VUSU en España. Este hallazgo, junto con la positividad encontrada en aves residentes en zonas rurales y periurbanas, especialmente en algunos ejemplares juveniles, indicaría una circulación activa de este virus y su posible mantenimiento en un ciclo endémico en esta región del suroeste de España. La circulación de este virus en nuevas especies de aves próximas a las áreas urbanas representa una amenaza para la Salud Pública, siendo necesario incluirlo en los diagnósticos diferenciales de los pacientes con síntomas compatibles. Por lo tanto, sería conveniente establecer programas de vigilancia específicos para este virus en aves y mosquitos en esta región que incluyan áreas urbanas y periurbanas, con el objetivo de recoger información sobre la evolución y distribución de este virus para así poder prevenir posibles brotes de este flavivirus emergente.

Research Article

Identification of Usutu Virus Africa 3 Lineage in a Survey of Mosquitoes and Birds from Urban Areas of Western Spain

Daniel Bravo-Barriga ^{1,2}, Martina Ferraguti ^{2,3}, Sergio Magallanes ^{2,4},
Pilar Aguilera-Sepúlveda ⁵, Francisco Llorente ⁵, Elisa Pérez-Ramírez ⁵,
Ana Vázquez ^{6,7}, Fátima Guerrero-Carvajal ¹, María Paz Sánchez-Seco ^{6,8},
Miguel Ángel Jiménez-Clavero ^{5,7}, Carlos Mora-Rubio ², Alfonso Marzal ^{2,9},
Eva Frontera ¹ and Florentino de Lope ²

¹Universidad de Extremadura, Facultad de Veterinaria, Departamento de Sanidad Animal, Parasitología, Avda. Universidad s/n, Cáceres 10003, Spain

²Universidad de Extremadura, Facultad de Biología, Departamento de Anatomía, Biología celular y Zoología, Avenida de Elvas s/n, Badajoz 06006, Spain

³University of Amsterdam, Department of Theoretical and Computational Ecology (TCE), Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics (IBED), Science Park 904, Amsterdam 1098 XH, Netherlands

⁴Estación Biológica de Doñana (EBD-CSIC), Departamento de Ecología de los Humedales, Avda. Américo Vespucio 26, Sevilla 41092, Spain

⁵Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), CSIC, Valdeolmos 28130, Spain

⁶Laboratorio de Arbovirus y Enfermedades Virales Importadas, CNM-Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda 28220, Madrid, Spain

⁷Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain

⁸Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Madrid, Spain

⁹Grupo de Investigación y Sostenibilidad Ambiental, Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Peru

Correspondence should be addressed to Martina Ferraguti; martina.ferraguti@gmail.com

Received 31 October 2022; Revised 8 November 2022; Accepted 11 November 2022; Published 22 February 2023

Academic Editor: Edgar Simulundu

Copyright © 2023 Daniel Bravo-Barriga et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Usutu virus (USUV) is an emerging zoonotic arbovirus that has caused an increasing number of animal and human cases in Europe in recent years. Understanding the vector species and avian hosts involved in the USUV enzootic cycle in an area of active circulation is vital to anticipate potential outbreaks. Mosquitoes were captured in 2020, while wild birds were sampled in both 2020 and 2021 in Extremadura, southwestern Spain. The presence of USUV in the mosquito vectors was assessed by a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (rRT-PCR) assay and confirmed by sequencing amplicons from two generic RT-PCR sets for flaviviruses. Sequences were analysed phylogenetically. Bird sera were screened for flavivirus antibodies with a blocking ELISA kit and subsequently tested for virus-specific antibodies with a micro-virus-neutralization test. Overall, 6,004 mosquitoes belonging to 13 species were captured, including some well-known flavivirus vectors (*Culex pipiens*, *Cx. perexiguus*, and *Cx. univittatus*). Of the 438 pools tested, USUV was detected in two pools of *Cx. pipiens*. Phylogenetic analysis using a fragment of the NS5 gene assigned the USUV detected the Africa 3 lineage. Out of 1,413 wild birds tested, USUV-specific antibodies were detected in 17 birds (1.2%, 10 males and 7 females) from eight species. The first detection of USUV Africa 3 lineage in mosquitoes from Spain, together with serologically positive resident wild birds in urban and rural areas, indicates active circulation and a possible risk of exposure for the human population, with necessity to establish specific surveillance plans.

1. Introduction

Usutu virus (USUV) is a mosquito-borne flavivirus (family Flaviviridae), closely related antigenically and genetically to West Nile virus (WNV) and belonging to the Japanese encephalitis serocomplex. In nature, USUV is maintained in a bird-mosquito-bird enzootic cycle [1]. However, the virus has also been detected sporadically in humans, horses, and other mammals, acting as incidental hosts (dead-end hosts, i.e., they can be infected but do not transmit the infection), and in a limited number of cases, they can suffer neuroinvasive disease and USUV fever [2, 3].

The first detection of USUV was in *Culex neavei* mosquitoes from South Africa in 1959, in a close area to the Usutu River in Swaziland [4]. Afterwards, the virus was retrospectively detected in archived tissue samples from birds from Italy collected in 1996 [5]. In 2001, USUV was identified as the causative agent of massive bird mortality in Austria [6]. Since then, USUV has been detected in several European countries in mosquitoes, birds, various mammals (horses, bats, ruminants, dogs, and wild boars), and humans [1, 3, 7–9].

In recent years, the understanding of the ecology, epidemiology, and distribution of USUV has improved due to an increase in its detection as a result of enhanced flavivirus surveillance and research activities in Europe [3, 10]. So far, eight lineages of USUV have been described, five European lineages (Europe 1–5) and three African lineages (Africa 1–3) [11]. The great diversity of lineages circulating in Europe suggests different introductions from Africa, as well as a continuous geographical spreading across the continent and colonization of new ecological niches [10, 12]. The rapid European expansion of the virus, together with several reports of infection cases or neuroinvasive diseases in humans, has confirmed USUV as an emerging zoonotic virus of public health significance [1, 3].

In Spain, USUV-specific antibodies have been detected from different species of wild birds, horses, and red deer [13]. In mosquitoes, USUV has been identified in *Culex pipiens* in 2006 (northeastern Spain) and in *Culex perexiguus* in 2009 (southern Spain), both belonging to the USUV Africa 2 lineage [14, 15]. Another USUV sequence was also obtained in 2012 from a song thrush (*Turdus philomelos*) related to a Senegalese and Central European sequences, although without a clear classification [16, 17]. In the region of this study, Extremadura (southwestern Spain), USUV antibodies were detected for the first time in 2017–2019 in horses and wild birds [18–20], but evidence from mosquitoes or humans has not been reported yet.

To date, field studies focusing on USUV enzootic cycle are scarce. USUV shares important features with WNV, including a degree of overlapping ranges of vector species and avian hosts, as well as some cross-reactivity in diagnostic methods. Hence, combined surveillance and control programs of both viruses offer important benefits, contributing to improve the understanding of their epidemiology and the potential interactions which may affect the transmission of both pathogens under natural conditions. Here, we report the concomitant detection of the USUV genome in

mosquitoes and USUV antibodies in avian hosts, confirming the presence of an enzootic cycle in an area close to urban centers from southwestern Spain.

2. Materials and Methods

2.1. Study Area. Five sampling sites were selected in Extremadura (southwestern Spain) with suitable habitats for wild birds and mosquitoes. One in a rural location (A: Asesera, 38°39'15"N, 7°13'1"W) and four close to the city of Badajoz (B: Rincón de Caya (38°51'31"N, 7°1'44"W), C: Bótoa (38°53'10"N, 6°55'32"W), D: Gévora (38°54'49"N, 6°57'31"W), and E: Sagras (38°55'45"N, 6°54'2"W)) (Figure 1). Badajoz is the largest urban nucleus (152,764 inhabitants) of the Autonomous Community of Extremadura. Most of the sampling sites were located close to the border with Portugal and the Guadiana River. Extremadura region has a Mediterranean climate classified as Csa (hot dry summer) according to the Köppen climate classification.

2.2. Sampling of Mosquitoes and Wild Birds. Mosquitoes were collected from May to November 2020. Entomological sampling was carried out every 40 days, and each trap was set from sunset to early morning, during a minimum of 12 hours. The combination of different traps (i.e., BG-Sentinel traps, CDC miniature light-traps, both containing CO₂ as bait, and gravid traps baited with hay infusion) ensured a more complete sampling of the vector community present in the area, with a greater diversity of species and catch density [21]. On the following morning, mosquitoes were frozen in the field with dry ice and transported to the laboratory for their morphological identification and molecular analysis.

Morphological identifications at species level were based on broadly used identification keys [22]. The whole process was carried out under binocular magnifying glass with frozen plates to ensure the maintenance of the cold chain. Mosquitoes were grouped by species, collection site, and dates in pools of 1–25 individuals and conserved in the MEM culture medium. Males were equally identified and classified to be considered in abundance estimates but not analysed for USUV detection.

Molecular analyses were performed to confirm the identification of epidemiologically important mosquito species that are difficult to identify morphologically. For this purpose, genomic DNA (gDNA) was extracted from the legs of individuals using GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific Inc., reference #K0722) following the manufacturer's instructions. The cytochrome oxidase 1 (*cox1*) gene was partially amplified using the primer set LCO1490 and HCO2198 following the PCR protocol described previously [23]. The amplified product was sequenced on an ABI 3130 genetic analyser (provided by the Service of Bioscience Applied Techniques of the University of Extremadura, SAIUEX), and the sequences were edited through BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.2.5, Carlsbad, CA, U.S.A.). Identification of mosquitoes to species level was obtained by taking into account the highest

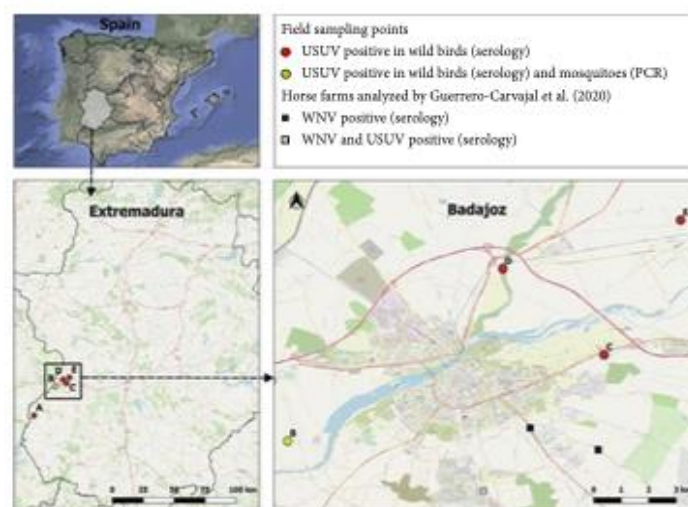


FIGURE 1: Geographical distribution and results of USUV by serology and PCR in the five sampling points (A: Asesera, B: Rincón de Caya, C: Bótoa, D: Gévora, and E: Sagrajas) in Extremadura, Spain. This map was created by the QGIS geographic information system, version 3.22.0 (2021) (QGIS association, <https://www.qgis.org/es/site>).

similarity, using BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and the Barcode of Life Data Systems-v4 databases. The respective nucleotide sequences obtained were deposited in the DNA Data Bank of Japan (DDBJ: <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>) under accession no. LC659916–8.

Wild birds were captured using mist-nets from February to December 2020 and from March to May 2021. Each bird was ringed with a numbered metal ring, and its age and sex were determined when possible, according to their plumage characteristics and skull ossification [24]. For each individual, a blood sample was extracted from the jugular vein using sterile insulin syringes. The volume of extracted blood varied depending on the body size of each bird and never exceeded 1% of their body mass. Blood samples were transferred to sterile Eppendorf tubes and preserved in cold boxes during the field work. In the laboratory, the samples were kept at 4°C and centrifuged within 24 h after sampling for 10 min at 11,000 rpm (11.2 g) to separate serum and cellular fractions, which were frozen at –80 or –20°C, respectively. Birds were immediately released unharmed at the site of capture after manipulation.

2.3. Detection of the Flavivirus Genome in Mosquitoes and Phylogenetic Analyses. Viral RNA was extracted from mosquito pools using a MagMax™ Pathogen RNA/DNA kit (ThermoFisher®), according to the manufacturer's protocol (Pub. no. 4463379). At least one negative control and a triplex positive extraction control (for WNV-L1, WNV-L2, and USUV) from inactivated viral cultures were included in each nucleic acid extraction run. Before extraction, 500 µl of MEM, 1x prepared with antibiotics (penicillin and

streptomycin), L-Glutamine, and inactivated foetal bovine serum, was added to each tube and mosquito pools were crushed. A volume of 200 µl of this mix was used for RNA extraction. For flavivirus detection, a triplex real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (rRT-PCR), which simultaneously detects and differentiates WNV-L1, WNV-L2, and USUV, was employed [25]. For the characterization of USUV-positive pools, we used two overlapping generic RT-nested-PCR to detect flavivirus genome on the NS5 gene region [26, 27]. The amplified products were visualized by electrophoresis on a 1.5% agarose gel and were purified using ExoSAP-IT kit (GE Healthcare). The purified DNA was Sanger-sequenced in duplicates in both directions using the same primer sets of the RT-nested-PCR assays. Analysis of the sequences and assembly was performed by using SeqMan software (DNASTAR LASERGENE Software). The genome sequence obtained in this study was submitted to GenBank database (accession no. ON838179). Multiple alignments were performed using ClustalW program, and the best-fitting evolutionary model was based on those defined using JModeltest2 [28] on the basis of the Akaike information criterion. Tree reconstruction was carried out with Mega 11 [29]. Two phylogenetic analyses were performed on the basis of 1030 and 238-nucleotide fragment of the NS5 gene using the maximum likelihood (ML) method, Kimura 2-parameter model, and the general time reversible model [30]. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying the Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a pairwise distances matrix estimated using the maximum composite likelihood approach and then selecting the topology with a higher log likelihood value. All positions containing gaps and missing data were eliminated. Bootstrap coefficients were calculated for 1000 replicates.

2.4. Detection of Flavivirus Antibodies in Wild Birds. Bird sera were screened to detect flavivirus antibodies with the blocking ELISA kit INGEZIM West Nile COMPAC (INGENASA, Spain), following the manufacturer's protocol. Although this ELISA kit is highly sensitive for WNV, cross-reacting antibodies to other closely related flaviviruses such as USUV may also react [18, 31]. Thus, in order to specifically detect USUV-neutralizing antibodies and differentiate from other cross-reacting flaviviruses, ELISA-positive and doubtful sera were subsequently analysed with a micro-virus-neutralization test (micro-VNT) in 96-well microtitre plates as described in [31]. Ten bird serum samples lacked enough volume so that they could not be analysed by micro-VNT.

Micro-VNTs were performed in parallel against USUV, WNV, and Bagaza virus (BAGV) as described in [31]. Viral strains used in this assay were USUV SAAR-1776 (accession no. AY453412), WNV E101 (accession no. AF260968), and BAGV Spain/RLP-Hcc1/2010 (accession no. KR108244). Samples yielding neutralization (complete absence of CPE) at 1:10 or higher was scored as positives. To confirm antibodies as specific for a determined virus, antibody titre should be at least fourfold higher for a given flavivirus over the rest [32]. If that threshold was not reached, the specific flavivirus that caused the infection could not be determined. Sera were considered USUV-positive only if the positive/doubtful result by ELISA was confirmed by VNT. In this study, we focused on the USUV results, as the WNV outcomes are part of a different survey (unpublished data).

2.5. Statistical Analysis. The estimated prevalence of USUV in mosquitoes and the corresponding 95% CI from variable pool size and perfect tests were calculated with the *EpiTools* epidemiological calculator method (<https://epitools.ausvet.com.au/ppvariablepoolsize>). This method estimates prevalence and confidence limits for variable pool sizes and assumes 100% test sensitivity and specificity [33].

The prevalence of flavivirus antibodies detected by ELISA and USUV-specific antibodies determined by micro-VNT were estimated as the ratio of positives from the total number of samples analysed, with the exact binomial confidence intervals (CI) of 95% based on the score method [34]. This prevalence should be considered as underestimated, or at least as the minimum detectable prevalence, taking into account that the potential cross-reactions detected with the ELISA test could not detect all sera with USUV antibodies. Descriptive statistical analyses were conducted in IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0 (Armonk, NY: IBM Corp.).

3. Results and Discussion

3.1. Results. Overall, we collected 6,004 (5,862 female and 142 male) mosquitoes belonging to four genera and 13 species: *Cx. pipiens* ($n=4,622$), *Culex theileri* ($n=535$), *Culex perexiguus/univittatus* ($n=300$), *Aedes caspius* ($n=276$), *Aedes vexans* ($n=90$), *Anopheles atroparvus* ($n=90$), *Culiseta longiareolata* ($n=47$), *Culiseta annulata*

($n=14$), *Aedes pulcritarsis* ($n=13$), *Aedes berlandi* ($n=10$), *Aedes echinus* ($n=4$), and *Culiseta subochrea* ($n=3$). The sequences obtained from three specimens of the *Univittatus* subgroup confirmed the presence in the same sampling site (B) (Figure 1) of *Cx. univittatus* (accession numbers: LC659916-7) and *Cx. perexiguus* (accession numbers: LC659918).

All the female mosquitoes were grouped in 438 pools. Of these, two pools of *Cx. pipiens* mosquitoes were positive for USUV by rRT-PCR, one captured on 16th August and one on 25th October in the same sampling site (B) (Figure 1). The vector infection rate for USUV in *Cx. pipiens* species was 4e-04% (95% CI: $1e^{-04}$ –0.0014). A fragment of 1,030 nucleotides of the USUV NS5 gene was obtained from one *Cx. pipiens* pool (accession no. ON838179). The phylogenetic analysis showed the obtained sequence clusters with other sequences belonging to the USUV Africa 3 lineage, previously detected in Africa and several European countries (Figure 2). Indeed, the sequence obtained in *Cx. pipiens* mosquitoes from Extremadura differs from previous Spanish sequences obtained from mosquitoes captured in Catalonia and Andalusia (in 2006 and 2009 from *Cx. pipiens* and *Cx. perexiguus*, respectively). Besides, our sequence even differs in the analysis of the 238-nucleotides fragment of the overlapping sequence obtained from Spanish song thrushes in 2012 (accession no. KC437386) (S1).

Out of 1,413 wild bird sera, 103 were positive by competition ELISA (7.29%, 95% CI: 6.05–8.76) and 77 sera (5.45%, 95% CI: 4.38–6.76) were assigned as doubtful. USUV-specific antibodies were confirmed by micro-VNT in 17 birds (1.2%, 95% CI: 0.75–1.92), ten males and seven females from eight different species, three of them found infected for the first time in Europe (Table 1). Neutralizing USUV titres ranged from 1:10 to 1:320, detecting 7 samples $\leq 1:40$.

Most of the positive birds were adults, except for four juvenile females captured in 2020: two Azure-winged magpies (*Cyanopica cyanus*), one great tit (*Parus major*), and one red avadavat (*Amandava amandava*) (Table 1). Sero-positive birds were detected in all sampling areas (Figure 1).

3.2. Discussion. The detection of USUV in mosquitoes and wild birds from urban and rural areas has proven to be effective both to assess the epidemiological situation after outbreaks and to forecast possible future risks [35–37]. The survey carried out in this study with the analysis of mosquitoes and birds confirmed active USUV circulation in areas close to urban centers from southwestern Spain, providing new evidence that adds up to previous studies that had detected WNV and USUV antibodies in horses and birds in the same area in 2017–2019 [19, 20].

Mosquito pools positive for the presence of USUV belong to *Cx. pipiens* species, and they were captured in late summer-early autumn at the sampling site B (Figure 1). In other European countries, USUV-positive mosquitoes have usually been detected between June and October [12, 15].

Different mosquitoes, mainly ornithophilic species of the *Culex* genus, are known to participate in the transmission of



FIGURE 2: Phylogenetic analysis of a 1,030-nucleotide fragment of the NS5 gene using the maximum likelihood method and Kimura 2-parameter model. This analysis involved 52 nucleotide sequences and a total of 1,028 positions in the final dataset. Sequence obtained in this study is highlighted in red (accession no. ON838179), and the Spanish USUV sequence obtained from mosquitoes is marked with a black triangle. The percentage of replicate trees in which the associated taxa are clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches. Only bootstrap >75% is shown. Taxon information indicated in the branches includes the country of origin, isolation/detection year, host, and GenBank accession number. USUV genetic sublineages are indicated on the right.

TABLE 1: Results obtained for positive/doubtful samples by ELISA and with Usutu virus-specific antibodies by micro-VNT in wild birds from Extremadura, Spain.

Sampling sites	Species name	Common name	Age	Behaviour	Sex	Date	ELISA test	USUV VNT titre
A: Asesera	<i>Lanius senator</i> *	Woodchat shrike	Adult	Migratory	Male	18/06/2020	Doubtful	1:10
B: Rincón de Caya	<i>Turdus merula</i>	Blackbird	Adult	Native	Female	30/06/2020	Doubtful	1:160
C: Bótoa	<i>Delichon urbicum</i>	House martin	Adult	Migratory	Male	12/06/2020	Doubtful	1:40
	<i>Delichon urbicum</i>	House martin	Adult	Migratory	Female	12/06/2020	Doubtful	1:20
	<i>Luscinia megarhynchos</i> *	Common nightingale	Adult	Migratory	Male	15/06/2020	Positive	1:80
	<i>Sylvia atricapilla</i>	Eurasian blackcap	Adult	Native	Female	15/06/2020	Positive	1:20
	<i>Sylvia atricapilla</i>	Eurasian blackcap	Adult	Native	Male	15/06/2020	Positive	1:40
	<i>Turdus merula</i>	Blackbird	Adult	Native	Male	15/06/2020	Doubtful	1:160
	<i>Turdus merula</i>	Blackbird	Adult	Native	Male	15/06/2020	Positive	1:160
	<i>Cyanopica cooki</i>	Azure-winged magpies	Juvenile	Native	Female	10/08/2020	Positive	1:10
D: Gévora	<i>Cyanopica cooki</i>	Azure-winged magpies	Juvenile	Native	Male	10/08/2020	Positive	1:40
	<i>Parus major</i>	Great tit	Juvenile	Native	Female	24/07/2020	Doubtful	1:80
	<i>Sylvia atricapilla</i>	Eurasian blackcap	Adult	Native	Male	16/07/2020	Positive	1:160
	<i>Turdus merula</i>	Blackbird	Adult	Native	Female	24/03/2021	Positive	1:320
	<i>Turdus merula</i>	Blackbird	Adult	Native	Male	24/03/2021	Positive	1:160
	<i>Turdus merula</i>	Blackbird	Adult	Native	Male	24/03/2021	Positive	1:80
	<i>Amandava amandava</i> *	Red avadavat	Juvenile	Exotic	Female	12/01/2020	Positive	1:160

*Species that have been detected with specific USUV antibodies for the first time in Europe.

USUV to wild or captive avifauna [1]. *Cx. pipiens* is a proven vector for USUV, and this virus has already been detected in specimens of this mosquito species in Europe [1], including Spain [14]. *Culex pipiens* was the most abundant mosquito species captured in this study, mainly in urbanized areas, the mosquito species with the greatest distribution in Extremadura [38]. It has been suggested to play a key role in the epizootic transmission of pathogens to humans [39]. So, it should be taken into account in control programs due to its potential for transmitting zoonotic flaviviruses in areas close to urban environments.

In Spain, USUV sequences of Africa 2 lineage have been detected in mosquitoes from Catalonia (*Cx. pipiens*, 2006) and Andalusia (*Cx. perexiguus*, 2009) [14, 15] and other unclassified USUV lineage in *T. philomelos* in 2012 [17]. Our study represents the first clear identification of USUV Africa 3 lineage in Spain. USUV strains of Africa 3 lineages were previously detected in Europe in *Cx. pipiens* mosquitoes in southern France [7, 12] and in common blackbirds (*Turdus*

merula) from Germany (2014), Belgium (2016) [11], France (2018) [12], Austria (2017) [40], Czech Republic (2018) [35], the Netherlands [41, 42], the United Kingdom (2020) [43], and Luxembourg in 2020 [44].

In November 2012, USUV was detected in a song thrush (*Turdus philomelos*) from a die-off of ≈10 birds on a hunting estate in southern Spain [17]. Here, we found six seropositive common blackbirds. Considering that common blackbirds showed high morbidity and mortality rates due to the USUV infection in different European countries [45], possibly *Turdus* sp. may represent a key host in the USUV epidemiology. However, the high number of seropositive individuals from this species may raise other questions: has there been a trade-off between the adaptation of the virus to this species and its increased survival of the disease? Or is the Africa 3 lineage less pathogenic to blackbirds than other lineages circulating in Europe? Accordingly, the histological lesion severity in common blackbirds for the two identified lineages (Europe 3 and Africa 3) was compared, showing no

significant differences [41]. Thus, it is likely that both lineages may produce a similar pathogenetic effect in naturally infected animals.

Spain is the southernmost country in Europe where USUV has been detected, and the sequence obtained is closely related to another sequence from France detected in 2018 [12]. As both sequences differ from other variants circulating in northern countries, this clade may represent an independent introduction event followed by geographical spread. As new sequences are continuously published, future analyses will allow us to better understand the spread dynamics of the USUV Africa 3 lineage in Europe and further decipher its evolutionary history.

Outside Europe, the Africa 3 lineage of USUV has been detected in mosquito species of the *Univittatus* subgroup (*Cx. perexiguus*, *Cx. univittatus*, and *Cx. neavei*) from Senegal [46], Uganda [47], and Israel [48], in *Cx. perfuscus* from Senegal and the Central African Republic [46], and in *Ae. albopictus* from Israel (unpublished, GenBank: MG461308.1). The presence of *Cx. perexiguus* and *Cx. univittatus*, important vectors of WNV and USUV, has already been reported in Extremadura [18]. Here, we confirmed the presence of both species in the same areas, which may imply a higher risk of flavivirus transmission considering that WNV lineage 1 was detected in *Cx. univittatus* in Portugal [49], and WNV lineage 1 and USUV Africa 2 lineage were detected in *Cx. pipiens* and *Cx. perexiguus* species in Spain, respectively [15, 50]. The difficult morphological differentiation of adult specimens of the *Univittatus* subgroup, together with their possible presence in the same habitats requires special care in their identification during entomological surveys, at least in the south of the Iberian Peninsula.

USUV antibodies were detected in birds from all sampling sites, including locality A, which is 41 km away from the city of Badajoz. In previous transmission seasons, USUV-specific antibodies were found in birds and horses in several areas from the Extremadura region [18–20]. The data obtained in this study confirm the occurrence of local transmission in 2020, with probable overwintering from past transmission seasons after its introduction in the area, indicating the establishment of an USUV enzootic cycle in southwestern Spain. In Europe, evidence of USUV infection has been found in at least 93 bird species from 35 families [1]. With this study, we enlarge the list of USUV hosts, including woodchat shrike (*Lanius senator*), common nightingale (*Luscinia megarhynchos*), and red avadavat (*Amandava amandava*). In the case of the woodchat shrike and common nightingale, both species breed in the Iberian Peninsula but are trans-Saharan migrants [51, 52]. The red avadavat is a bird indigenous to Asia which was introduced in the south of the Iberian Peninsula and Extremadura more than 40 years ago [53].

Overall, more than 75% of the positive birds of this study are resident species (and some juvenile specimens) with limited geographical mobility, which strongly indicates endemicity and establishment of the USUV in the region, considering that specific antibodies against this virus have

been detected in different species since 2017 [18, 20]. Furthermore, the observed USUV seroprevalence in the area (1.2%) is similar to previous studies in wild birds in nearby sampling areas (0.96%) [20] and in birds from rehabilitation centres (1.4%) [18].

Nevertheless, we are aware of the methodological limitations of the present study and these findings should be interpreted with caution. The ELISA kit employed for screening was developed specifically for the detection of antibodies against WNV. Nevertheless, and in the absence of a commercial ELISA kit for specific USUV detection, its cross-reactivity with antibodies directed to other flaviviruses led to think it may be useful in USUV surveillance studies [31], but with unknown and possibly underestimated efficacy.

USUV and WNV share environmental and ecological drivers. Thus, cocirculation is often observed in nature [9, 19, 54, 55]. Indeed, both pathogens circulate within the same vectors in Spain (i.e., *Cx. pipiens* and *Cx. perexiguus*) [14, 15]. Consequently, USUV should be included, together with WNV, in surveillance programs and differential diagnoses in humans and animals. This recommendation is supported owing to the fact that 16 of 17 positive samples were obtained from birds captured at less than 5 km of the city centre and that 12 of these samples correspond to resident birds. Although some USUV acute neurological human cases have been reported (e.g., encephalitis or meningoencephalitis) [2], in most cases, USUV (and WNV) infections are asymptomatic or cause mild clinical symptoms [1]. Therefore, the actual incidence of USUV infection in humans in the region is essentially unknown, and thus, its epidemiological status and actual burden in public health is likely underestimated. Further epidemiological studies about USUV and other flaviviruses are warranted, especially considering the current scenario of increasing urbanisation, where human activities, such as animal husbandry and intensive agriculture, greatly influence the dynamics of vector-borne diseases through their impact on the distribution of hosts [56] and mosquito species [57–59].

4. Conclusions

In summary, this is the first identification USUV Africa 3 lineage in Spain. The detection of USUV in mosquitoes by RT-PCR and USUV-specific antibodies in wild birds (especially in juveniles) is indicative of an active circulation of the virus and the possible establishment of its enzootic cycle in southwestern Spain. The circulation of USUV close to urban areas represents a public health threat that demands its inclusion in the differential diagnoses in patients with compatible symptoms. Therefore, it is highly advisable to establish integrated bird and mosquito survey programs in the region, targeting urban and rural areas with the aim to collect relevant data on the epidemiological scenario represented by emerging flaviviruses, including USUV, and its

evolution and spread, which may reveal new foci, seasonality, and ecological niches of USUV.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Ethical Approval

Bird trapping was carried out with all necessary permits with the current regional and national laws of Spain. Bird and mosquito sampling on private land and in private residential areas were conducted with all the necessary permits and consent from the owners. Methods were evaluated and approved by the institutional Commission of Bioethics of University of Extremadura (CBUE 49/2019) and by Junta de Extremadura Local Government (87/2019).

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to Juan Antonio Ortiz and Gonzalo Cidoncha for their help in the fieldwork and to Irene Hernández and Laura Herrero for their assistance in the laboratory. The authors also appreciate the technical support provided by SAIUEX with the molecular analyses (financed by UEX, Junta de Extremadura, MICINN, FEDER, and FSE). This study was funded from Ayudas Fundación BBVA a Equipos de Investigación Científica 2019 (PR (19_ECO_0070)), Research State Agency Project (PID2020-116768RR-C21/C22), Instituto de Salud Carlos III (PI19CIII_00014), Consejería de Economía e Infraestructura of the Junta de Extremadura, and the European Regional Development Fund, a Way to Make Europe, through the research project under grant numbers IB20089, GR21122, and GR21084. MF was supported by a Juan de la Cierva 2017 Formación contract (FJCI-2017-34394) from the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities, and she is currently funded by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement no. 844285, "EpiEcoMod." CMR was funded by a FPU grant from the Ministry of Universities of Spain (reference: FPU20/01039). FGC was supported by "Ayudas a la Formación Investigador Predoctoral 2018" Formative contract (PD18056) from the Extremadura Regional Government.

Supplementary Materials

Figure S1: phylogenetic analysis of a 238-nucleotide fragment of the NS5 gene using the maximum likelihood method and Kimura 2-parameter model. This analysis involved 43 nucleotide sequences. The sequence obtained in this study is highlighted in red (accession no. ON838179),

the Spanish USUV sequence obtained from birds is marked with a black square, and that obtained from mosquitoes is marked with a black triangle. The percentage of replicate trees in which the associated taxa are clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches. Taxon information indicated in the branches includes the country of origin, isolation/detection year, host, and GenBank accession number. The USUV genetic sub-lineages are indicated on the right. (*Supplementary Materials*)

References

- [1] M. Clé, C. Beck, S. Salinas et al., "Usutu virus: a new threat?" *Epidemiology and Infection*, vol. 147, p. e232, 2019.
- [2] M. Graninger, S. Hubmer, F. Riederer et al., "The first case of Usutu virus neuroinvasive disease in Austria, 2021," *Open Forum Infectious Diseases*, vol. 9, no. 7, 2022.
- [3] T. Vilbich-Cavlek, T. Petrovic, V. Savic et al., "Epidemiology of Usutu virus: the European scenario," *Pathogens*, vol. 9, no. 9, p. 699, 2020.
- [4] J. P. Woodall, "The viruses isolated from arthropods at the east African virus research institute in the 26 years ending december 1963," *Proceeding East African Academy*, vol. 2, pp. 141–146, 1964.
- [5] H. Weissenböck, T. Bakonyi, G. Rossi, P. Mani, and N. Nowotny, "Usutu virus, Italy, 1996," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 19, no. 2, pp. 274–277, 2013.
- [6] H. Weissenböck, J. Kolodziejek, A. Url, H. Lussy, B. Rebel-Bauder, and N. Nowotny, "Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne Flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 8, no. 7, pp. 652–656, 2002.
- [7] O. Constant, P. Gil, J. Barthelemy et al., "One health surveillance of West Nile and Usutu viruses: a repeated cross-sectional study exploring seroprevalence and endemicity in Southern France," *Euro Surveillance*, vol. 25, Article ID 2200068, 2022.
- [8] N. Fynmore, R. Lühken, K. Kliemke et al., "Honey-baited FTA cards in box gravid traps for the assessment of Usutu virus circulation in mosquito populations in Germany," *Acta Tropica*, vol. 235, 2022.
- [9] S. Zannoli and V. Sambri, "West Nile virus and Usutu virus co-circulation in Europe: epidemiology and implications," *Microorganisms*, vol. 7, no. 7, p. 184, 2019.
- [10] F. Roesch, A. Fajardo, G. Moratorio, and M. Vignuzzi, "Usutu virus: an arbovirus on the rise," *Viruses*, vol. 11, p. 640, 2019.
- [11] D. Cadar, R. Lühken, H. van der Jeugd et al., "Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, western Europe, 2016," *Euro Surveillance*, vol. 22, no. 4, 2017.
- [12] M. Eiden, P. Gil, U. Ziegler et al., "Emergence of two usutu virus lineages in *Culex pipiens* mosquitoes in the Camargue, France, 2015," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 61, pp. 151–154.
- [13] T. Vilbich-Cavlek, V. Savic, T. Petrovic et al., "Emerging trends in the epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in southern Europe," *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 6, no. 437, 2019.
- [14] N. Busquets, A. Alba, A. Allepuz, C. Aranda, and J. I. Núñez, "Usutu virus sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 14, no. 5, pp. 861–863, 2008.

- [15] A. Vázquez, S. Ruiz, L. Herrero et al., "West Nile and Usutu viruses in mosquitoes in Spain, 2008–2009," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 85, no. 1, pp. 178–181, 2011.
- [16] T. Bakonyi, N. Busquets, and N. Nowotny, "Comparison of complete genome sequences of Usutu virus strains detected in Spain, Central Europe, and Africa," *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 14, no. 5, pp. 324–329, 2014.
- [17] U. Höfle, V. Gamino, I. G. F. de Mera, A. J. Mangold, J.-A. Ortiz, and J. de la Fuente, "Usutu virus in migratory song thrushes, Spain," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 19, no. 7, pp. 1173–1175, 2013.
- [18] D. Bravo-Barriga, P. Aguilera-Sepúlveda, F. Guerrero-Carvajal et al., "West Nile and Usutu virus infections in wild birds admitted to rehabilitation centres in Extremadura, western Spain, 2017–2019," *Veterinary Microbiology*, vol. 255, Article ID 109020, 2021.
- [19] F. Guerrero-Carvajal, D. Bravo-Barriga, M. Martín-Cuervo et al., "Serological evidence of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids from western Spain," *Transboundary and Emerging Diseases*, vol. 68, no. 3, pp. 1432–1444, 2020.
- [20] A. Marzala, M. Ferraguti, J. Muriel et al., "Circulation of zoonotic flaviviruses in wild passerine birds in Western Spain," *Veterinary Microbiology*, vol. 268, Article ID 109399, 2022.
- [21] D. Roiz, M. Roussel, J. Munõz, S. Ruiz, R. Soriguer, and J. Figuerola, "Efficacy of mosquito traps for collecting potential West Nile mosquito vectors in a natural mediterranean wetland," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 86, no. 4, pp. 642–648, 2012.
- [22] N. Becker, D. Petric, M. Zgomba et al., "Mosquitoes. Identification," *Ecology and Control*, Switzerland: Springer International Publishing, 3rd edition, 2020.
- [23] O. Folmer, M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek, "DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates," *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, vol. 3, no. 5, pp. 294–299, 1994.
- [24] L. Svensson, K. Mullarney, and D. Zetterström, *Guía de aves: España, Europa y Región Mediterránea*, 2nd edition, Omega, Barcelona, Spain, 2010.
- [25] J. Del Amo, E. Sotelo, J. Fernández-Pinero et al., "A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus," *Journal of Virological Methods*, vol. 189, no. 2, pp. 321–327, 2013.
- [26] M. P. Sánchez-Seco, D. Rosario, C. Domingo et al., "Generic RT-Nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification," *Journal of Virological Methods*, vol. 126, no. 1–2, pp. 101–109, 2005.
- [27] A. Vázquez, M. P. Sánchez-Seco, G. Palacios et al., "Novel flaviviruses detected in different species of mosquitoes in Spain," *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 12, no. 3, pp. 223–229, 2012.
- [28] D. Darriba, G. L. Taboada, R. Doallo, and D. Posada, "jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing," *Nature Methods*, vol. 9, no. 8, p. 772, 2012.
- [29] K. Tamura, G. Stecher, and S. Kumar, "MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 38, no. 7, pp. 3022–3027, 2021.
- [30] M. Nei and S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, Oxford, UK, 2000.
- [31] F. Llorente, A. García-Irazábal, E. Pérez-Ramírez et al., "Influence of flavivirus co-circulation in serological diagnostics and surveillance: a model of study using West Nile, Usutu and Bagaza viruses," *Transboundary and Emerging Diseases*, vol. 66, no. 5, pp. 2100–2106, 2019.
- [32] C. H. Calisher, N. Karabatsos, J. M. Dalrymple et al., "Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera," *Journal of General Virology*, vol. 70, pp. 37–43, 1989.
- [33] C. J. Williams and C. M. Moffitt, "A critique of methods of sampling and reporting pathogens in populations of fish," *Journal of Aquatic Animal Health*, vol. 13, no. 4, pp. 300–309, 2001.
- [34] E. B. Wilson, "Probable inference, the law of succession, and statistical inference," *Journal of the American Statistical Association*, vol. 22, no. 158, pp. 209–212, 1927.
- [35] V. Hönig, M. Palus, T. Kaspar et al., "Multiple lineages of Usutu virus (Flaviviridae, flavivirus) in blackbirds (*Turdus merula*) and mosquitoes (*Culex pipiens*, *Cx. modestus*) in the Czech republic (2016–2019)," *Microorganisms*, vol. 7, no. 11, p. 568, 2019.
- [36] G. Kemenesi, Z. Soltész, K. Szentpáli-Gavallér et al., "Monitoring of West Nile virus in mosquitoes between 2011–2012 in Hungary," *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 14, no. 9, pp. 648–655, 2014.
- [37] A. Klobucar, V. Savic, M. C. Posavec et al., "Screening of mosquitoes for West Nile virus and Usutu virus in Croatia, 2015–2020," *Tropical Medicine and Infectious Disease*, vol. 6, no. 2, p. 45, 2021.
- [38] D. Bravo-Barriga, A. P. Gouveia de Almeida, S. Delacour-Estrella et al., "Mosquito fauna in Extremadura (western Spain): updated catalog with new records, distribution maps, and medical relevance," *Journal of Vector Ecology*, vol. 46, no. 1, pp. 1–11, 2021.
- [39] V. A. Brugman, L. M. Hernández-Triana, J. M. Medlock, A. R. Fooks, S. Carpenter, and N. Johnson, "The role of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) in virus transmission in Europe," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 15, no. 2, p. 389, 2018.
- [40] P. Weidinger, J. Kolodziejek, T. Bakonyi et al., "Different dynamics of Usutu virus infections in Austria and Hungary, 2017–2018," *Transboundary and Emerging Diseases*, vol. 67, no. 1, pp. 298–307, 2020.
- [41] G. Giglia, G. Agliani, B. B. Oude Munnink et al., "Pathology and pathogenesis of eurasian blackbirds (*Turdus merula*) naturally infected with Usutu virus," *Viruses*, vol. 13, no. 8, p. 1302, 2021.
- [42] B. B. Oude Munnink, E. Münzer, D. F. Nieuwenhuijse et al., "Genomic monitoring to understand the emergence and spread of Usutu virus in The Netherlands, 2016–2018," *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, 2020.
- [43] A. J. Folly, B. Lawson, F. Z. Lean et al., "Detection of Usutu virus infection in wild birds in the United Kingdom, 2020," *Euro Surveillance*, vol. 25, no. 41, pp. 1–5, 2020.
- [44] C. J. Snoeck, A. Sausy, S. Losch, F. Wildschutz, M. Bourg, and J. M. Hübschen, "Usutu virus Africa 3 lineage, Luxembourg, 2020," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 28, no. 5, p. 1076, 2022.
- [45] U. Ashraf, J. Ye, X. Ruan, S. Wan, B. Zhu, and S. Cao, "Usutu virus: an emerging flavivirus in Europe," *Viruses*, vol. 7, no. 1, p. 219, 2015.
- [46] B. Nikolay, A. Dupressoir, C. Firth et al., "Comparative full length genome sequence analysis of Usutu virus isolates from Africa," *Virology Journal*, vol. 10, 2013.

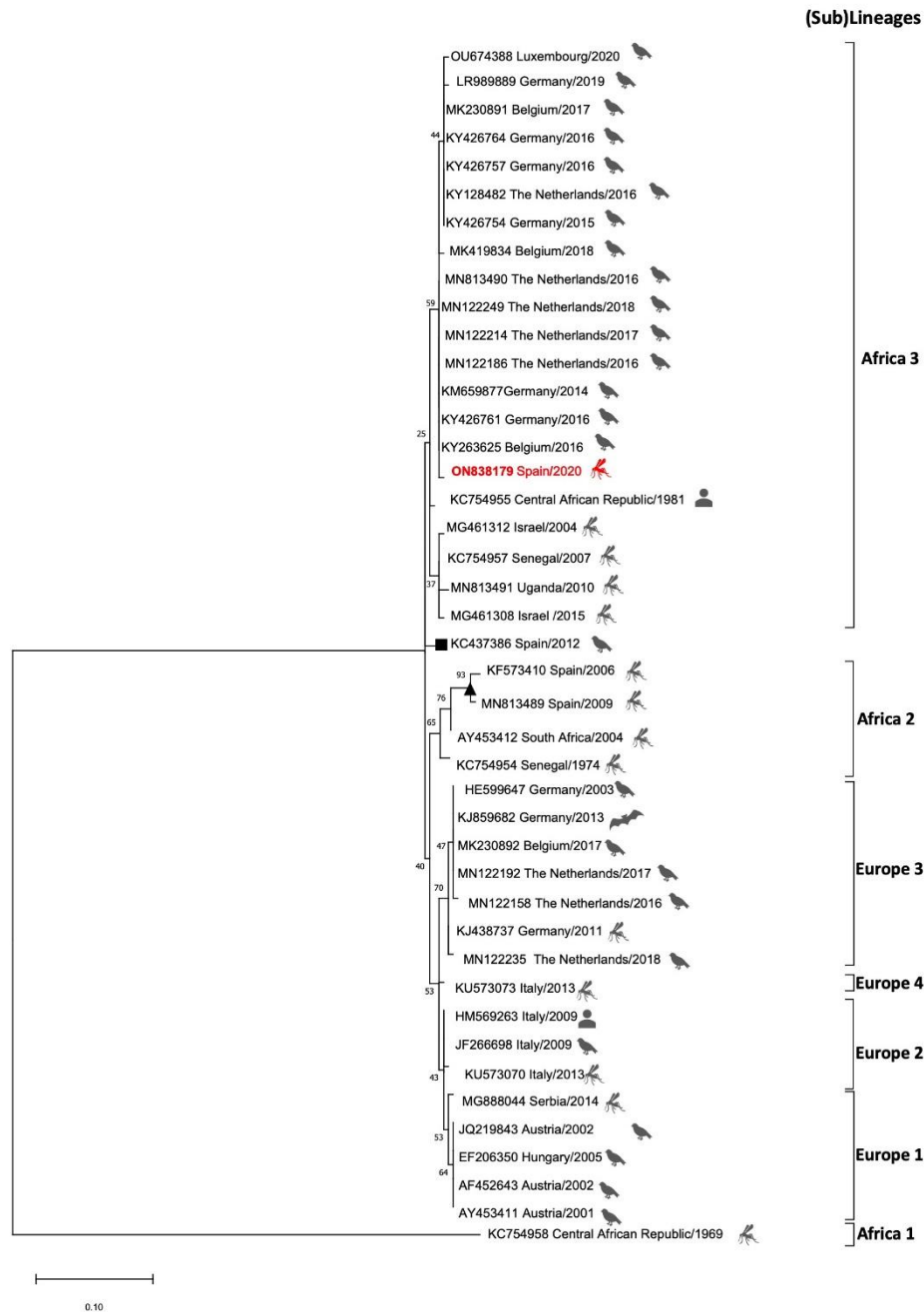


FIGURE S1. Phylogenetic analysis of a 238-nucleotide fragment of the NS5 gene using the Maximum Likelihood method and Kimura 2-parameter model. This analysis involved 43 nucleotide sequences. The sequence obtained in this study is highlighted in red (accession no. ON838179), the Spanish USUV sequence obtained from birds is marked with a black square and the obtained from mosquitoes with a black triangle. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. Taxon information indicated in the branches includes the country of origin, isolation/detection year, host, and GenBank accession number. USUV genetic sub-lineages are indicated on the right.

6.2. OTROS RESULTADOS

6.2.1. Diversidad y distribución de especies de mosquitos en zonas urbanas y periurbanas de las ciudades de Badajoz y Cáceres, España

Frontera, E.¹; **Guerrero-Carvajal, F.**¹; Becerra Canto, C.¹; Sánchez-Murillo, J.M.^{2,3}; Reina, D.¹; Pérez-Martín, J.E.¹; Alarcón-Elbal, P.M.^{4,5}; Bravo-Barriga, D.¹

¹ Unidad de Parasitología, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, España

² Departamento de Parasitología, Laboratorio de Sanidad Animal de Badajoz, Junta de Extremadura, España

³ Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Badajoz, España

⁴ Departamento de Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos (PASAPTA), Facultad de Veterinaria, Universidad CEU Cardenal Herrera, Valencia, España

⁵ Departamento de Investigación y Desarrollo (I+D), Laboratorios Lokímica, Paterna, Valencia, España

Revista del Colegio Oficial de Veterinarios de Badajoz (2022)., 26: 28-37.

Resumen

Las enfermedades vectoriales ocasionan al año un gran número de muertes en numerosos hospedadores a nivel mundial. Entre aquellos vectores de mayor importancia se encuentran los culícidos, pues transmiten arbovirus zoonóticos tan importantes como el dengue, Zika, chikunguña, el VNO y el VUSU, que afectan tanto a animales como a seres humanos. En la actualidad los cambios ambientales y sociológicos como el calentamiento global, la modificación de los ecosistemas y la globalización están favoreciendo la propagación de dichos vectores a diferentes regiones del mundo donde antes no se encontraban y, por ende, al patrón de distribución de estos patógenos. El conocimiento de la composición local de mosquitos, así como su distribución geográfica y estacional, es un paso crucial hacia el desarrollo e implementación de estrategias apropiadas para controlar las poblaciones de mosquitos vectores y, posteriormente, las enfermedades infecciosas transmitidas por mosquitos. Desgraciadamente, en algunas regiones españolas como Extremadura hay escasos trabajos en ciudades y zonas urbanas, por lo que se llevó a cabo una vigilancia activa entomológica para determinar la presencia, abundancia y distribución de mosquitos en dos zonas ciudades de Extremadura.

Se establecieron dos planes de vigilancia entomológica, una para culícidos adultos y otra específica para *Aedes albopictus* (mosquito tigre). La captura de culícidos adultos se realizó entre los meses de mayo de 2021 y abril de 2022 mediante trampas tipo CDC, BD–Sentinel, BG–Pro y ovitrampas, en un total de 20 puntos de muestreo, 9 en la ciudad de Badajoz y 11 en Cáceres. Se colocaron en diversas zonas urbanas y periurbanas como parques, jardines, riberas o paseos verdes con abundante vegetación y fuentes de agua. Para el mosquito tigre se procedió con el uso de ovitrampas en cuatro puntos en Extremadura, dos por cada ciudad entre los meses de mayo a noviembre del 2021, coincidiendo con los meses de mayor actividad vectorial. El número total de trampas en toda Extremadura fue de 13.

Se capturaron e identificaron un total de 8298 mosquitos adultos y 52 huevos de la familia Culicidae, correspondientes a 4 géneros y 18 especies diferentes (0,67% al género *Anopheles*, 2,03% al género *Aedes*, el 2,63% a *Culiseta* y 94,50% al género *Culex*). La especie más capturada fue *Culex pipiens* s.l. (86%), seguida de *Culex theileri* (8,16%), *Culiseta longiareolata* (2,31%), *Aedes caspius* (1,57%) y *Anopheles maculipennis* s.l. (0,66%). Se constata una amplia diversidad de mosquitos en zonas urbanas y periurbanas de Extremadura, siendo la especie *Cx. pipiens* la de mayor distribución y abundancia. Además, se registran por primera vez *Aedes vexans*, *Aedes vittatus*, *Ae. albopictus*, *Culex europaeus*, *Culex laticinctus* y *Culiseta subochrea* en el municipio de Cáceres, mientras que en Badajoz lo hacen *Aedes pulcritarsis*, *Cx. europaeus* y *Cx. laticinctus*.

Hay que destacar que como resultado de esta vigilancia y confirmado por análisis molecular, se ha podido confirmar la presencia por primera vez en zonas urbanas de algunas las especies *Culex univittatus* y *Culex perexiguus* que son importantes vectores de flavivirus, como el VNO. De hecho, *Cx. perexiguus* fue el principal protagonista en el foco producido por esta arbovirosis que se produjo en Andalucía y Extremadura en el verano de 2020. Además, se detecta también por primera vez huevos de *Ae. albopictus* (mosquito tigre) en la estación de autobuses de la ciudad de Cáceres, ampliándose los municipios donde se ha detectado esta especie invasora desde 2018 en Extremadura.

REVISTA DEL COLEGIO OFICIAL DE VETERINARIOS DE BADAJOZ

Núm. 26 • Junio 2022



BADAJOZ *Veterinaria*

**Diversidad y distribución
de especies de mosquitos
en las ciudades de
Cáceres y Badajoz**

**Entrevistamos a
Christian Gortázar**



*Rinitis proliferativa crónica
en ovino*



*Miastenia gravis adquirida
en perros*

BADAJOS
Veterinaria



DIRECTOR

José Marín Sánchez Murillo

EDITA

Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Badajoz

Avda. Santa Marina, 9. 06005. Badajoz

Teléfono: 924 23 07 39

Fax: 924 25 31 55

email: colvetba@colegiovetveterinariosbadajoz.com

web: www.colegiovetveterinariosbadajoz.com

CONSEJO EDITORIAL

Margarita Barreto Jiménez

Francisco Cordobés Fijo

Antonio Iglesias Pajuelo

José Marín Sánchez Murillo

Javier Ramos Galea

María Suárez Ramírez

Rafael Vázquez Caldito

REDACCIÓN Y PUBLICIDAD

Javier Pedraz Hernández

DISEÑO E IMPRESIÓN

Cromalia Digital Print S.L.

C/Ayala, 12. 06400. Don Benito

Teléfono: 924 80 81 75

DIFUSIÓN NACIONAL

Depósito Legal: BA-000615-2015

ISSN 2605-2156 Badajoz veterinaria (Ed. impresa)

ISSN 2605-2164 Badajoz veterinaria (Internet)

El criterio de los artículos, entrevistas, cartas y anuncios es responsabilidad exclusiva de sus autores y no refleja necesariamente la opinión de la Dirección de la revista y, por tanto, del Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Badajoz. Queda prohibida la reproducción total o parcial de la presente publicación sin la autorización del editor.

sumario

EDITORIAL 5

SANIDAD Y PRODUCCIÓN ANIMAL

Rinitis crónica proliferativa en ganado ovino. 6

SALUD PÚBLICA Y MEDIO AMBIENTE

Mecanismos de acción de antifúngicos naturales como sustitutos de aditivos sintéticos en la elaboración de embutidos curado-madurados 14

Incidencia de nódulos de "*Spirocerca*" en la pared gástrica de zorros de la zona centro de España 20

Diversidad y distribución de especies de mosquitos en zonas urbanas y periurbanas de las ciudades de Badajoz y Cáceres, España 28

HISTORIA DE LA VETERINARIA

El ganado porcino Ibérico Retinto de la variedad Oliventina 38

Julio Jiménez Ramos 46

Fotografías con historia 49

ENTREVISTAMOS A...

Christian Gortázar Schmidt 50

APARTADO CLÍNICO

Etología Clínica en los Centros Veterinarios o Psicología animal, una cuestión de salud. 54

Miastenia gravis adquirida en perros 60

Estudio de incidencia de *Dirofilaria immitis* en perros y gatos en Extremadura 66

Fotografía diagnóstica 70

MUVET

Nos visitan... 72

ACTUALIDAD COLEGIAL 74



**FRONTERA, E.¹; GUERRERO-CARVAJAL, F.¹; BECERRA CANTO, C.¹;
SÁNCHEZ-MURILLO, J.M.^{2,3}; REINA, D.¹; PÉREZ-MARTÍN, J.E.¹; ALÁRCÓN-
ELBAL, P.M.^{4,5}; BRAVO-BARRIGA, D.^{1*}**

¹ Unidad de Parasitología, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, España

² Departamento de Parasitología, Laboratorio de Sanidad Animal de Badajoz, Junta de Extremadura, España

³ Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Badajoz, España

⁴ Departamento de Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos (PASAPTA), Facultad de Veterinaria, Universidad CEU Cardenal Herrera, Valencia, España

⁵ Departamento de Investigación y Desarrollo (I+D), Laboratorios Lokímica, Paterna, Valencia, España

Diversidad y distribución de especies de mosquitos en zonas urbanas y periurbanas de las ciudades de Badajoz y Cáceres, España



salud pública y medio ambiente

Introducción

Las enfermedades vectoriales son aquellas transmitidas mayoritariamente por artrópodos, que actúan como vectores de distintos patógenos y que ocasionan cada año más de 700.000 muertes a nivel mundial (OMS, 2020). Entre dichos artrópodos se encuentran los mosquitos culicidos, flebotomos, chinches, simúlidos, garrapatas, moscas, ácaros, piojos, etc. Los importantes cambios, tanto ambientales como sociológicos, que incluyen el calentamiento global y la globalización, han afectado a las sociedades modernas con un impacto negativo de muchas de estas enfermedades vectoriales sobre los servicios de Salud Pública y Sanidad Animal. En los últimos tiempos, se está observando un auge de estas enfermedades vectoriales, debido, entre otras causas, al cambio climático, modificación de núcleos urbanos, así como el aumento exponencial del tráfico de viajeros, animales y mercancías (Chala y Hamde, 2021).

Extremadura no es ajena a estos desafíos, siendo absolutamente necesario mantener una vigilancia epidemiológica de estos vectores para evitar su difusión

y prevenir brotes indeseados de enfermedades vectoriales, como el ocurrido por el virus del Nilo occidental durante el verano de 2020 en nuestro país (García-San Miguel et al., 2020).

En la consciencia de esta necesidad, el Colegio Oficial de Veterinarios de Badajoz ha financiado íntegramente un proyecto de investigación, en colaboración con el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura (UEX), para determinar la presencia, abundancia y distribución de mosquitos, flebotomos y simúlidos, que, tanto por sus picaduras, como por su papel vectorial, alcanzan una especial relevancia sanitaria en las dos capitales de provincia de la comunidad, Badajoz y Cáceres.

Los resultados obtenidos de esta vigilancia permitirán determinar el riesgo real derivado de la presencia y abundancia de estos vectores en zonas urbanas y periurbanas de las ciudades, y cuya información será transferida a las instituciones responsables de la gestión de plagas en las ciudades, así como a las autoridades sanitarias correspondientes, con el fin de que se implanten las medidas

necesarias de prevención y control frente a dichos insectos.

Este artículo se concibe como el primero de una serie relacionados con este proyecto, en los que se mostrarán los principales resultados obtenidos en el mismo. Este primero se centra en los resultados derivados de las capturas de los mosquitos en ambas ciudades, al que seguirán un segundo, en el que se mostrarán los resultados observados tras las capturas de flebotomos y simúlidos, y un último artículo, donde se darán a conocer los resultados de la presencia de los distintos patógenos hallados en estos vectores.

Objetivos

En este primer artículo de la serie, los objetivos específicos se centran en los mosquitos de Badajoz y de Cáceres, a saber:

1. Identificar las principales especies de mosquitos en distintas zonas urbanas y periurbanas de ambas ciudades.
2. Conocer la distribución perimetral de los mismos.
3. Realizar una vigilancia específica de *Aedes albopictus* (mosquito tigre) en distintos puntos de las dos ciudades.
4. Analizar las preferencias alimentarias de las diferentes especies de mosquitos analizados.

Material y Métodos

A. Sistema de vigilancia de mosquitos culicidos en general

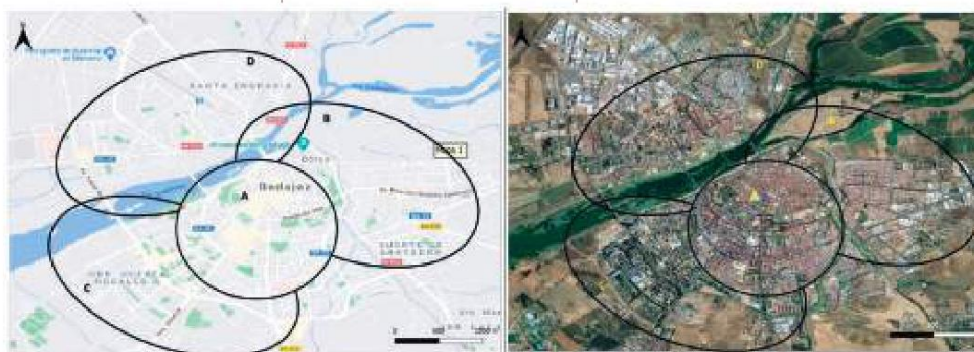


Figura 1: Zonas de muestreo en la ciudad de Badajoz. Izquierda vista mapa tradicional y derecha vista satélite. A) zona urbana. B, C y D) zonas periurbanas.



Figura 2: Zonas de muestreo en la ciudad de Cáceres. Izquierda vista mapa tradicional y derecha vista satélite. A) zona urbana. B y C) zonas periurbanas.

Se ha observado que los culicidos suelen encontrarse mayormente en lugares donde la vegetación es abundante y existen fuentes de agua cercanas, las cuales le permiten hacer la puesta de huevos de una forma ideal. La delimitación de zonas urbanas y periurbanas donde se llevaron a cabo los muestreos de este estudio en cada ciudad pueden verse en la Figura 1 y Figura 2.

Los puntos de muestreo elegidos han sido los presentes en la Tabla 1, que, como puede observarse, fueron 20 en total (9 en Badajoz y 11 en Cáceres), recogiendo muestras entre los meses de mayo de 2021 a abril de 2022. Además, adicionalmente se recogieron muestras de algunos puntos extras en la ciudad de Cáceres (Ej.; zona de Montesol, Olivar Chico, Paseo Alto, etc.) en función de los recursos materiales disponibles.

Tipo de trampas de captura empleadas:

Los mosquitos fueron capturados usando distintos tipos de trampas. La combinación de varias de ellas asegura una detección más completa de las diferentes especies de mosquitos y permite cap-

Municipio	Punto de muestreo	Municipio	Punto de muestreo
Badajoz	Parque Fluvial	Cáceres	Universidad-Veterinaria
Badajoz	Universidad-Ciencias	Cáceres	Universidad-Politécnica
Badajoz	Azud1	Cáceres	Mejostilla-Parque Ceres
Badajoz	Las Vagundas	Cáceres	Valhondo
Badajoz	Unión Rivillas-Calamón	Cáceres	Ribera del marces-nacimiento
Badajoz	Parque de la Legión (cambio de sitio por robos)	Cáceres	Zona Hospital San Pedro
Badajoz	Parque Castellar	Cáceres	Parque del Rodero
Badajoz	Azud2	Cáceres	Parque Israel-Est. Autob.
Badajoz	Residencial Golf Guadiana	Cáceres	Parque Franes
		Cáceres	Parque Pacifico
		Cáceres	Parque del Principe

Tabla 1: Puntos de muestreo de las ciudades de Badajoz y de Cáceres.

turar un número suficiente de muestras para análisis de patógenos. Los tipos de trampas fueron:

- Trampas CDC con luz ultravioleta: Se colocaron colgadas de árboles, a una distancia de un metro del suelo aproximadamente. Se cebaron con CO₂, como atrayente para los mosquitos (Figura 3).
- Trampas BG-Sentinel: Se colocaron en el suelo, en zonas con vegetación y, en la medida de lo posible, cerca de una fuente de agua (Figura 4). Se suplementaron con cebos atrayentes como BG-Lure® y CO₂.
- Trampas BG-pro: También se colocaron en el suelo y son similares a las BG-Sentinel, pero más pequeñas, para pasar más desapercibidas. Se suplementa-

ron con cebos atrayentes como BG-Lure® y CO₂.

- Ovitrampas: Con estas trampas no se capturan adultos (a diferencia de las anteriores), sino que sirven para la detección de huevos de *Ae. albopictus* u otras especies del género *Aedes*.



Figura 3: Trampa CDC con luz ultravioleta en un parque de la ciudad de Badajoz.

salud pública y medio ambiente

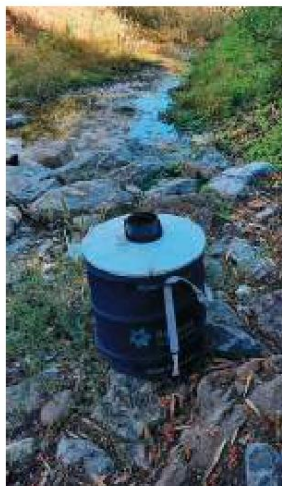


Figura 4: Trampa BG-Sentinel cerca de zona inundada en zona urbana.



Figura 5: Ovitrapa colocada cerca de una zona de caravanas para la vigilancia del mosquito tigre.

Identificación de mosquitos culicidos

La identificación morfológica de los culicidos se realizó sobre un soporte con placas frías, mediante observación estereomicroscópica de caracteres morfológicos a través de las claves indicadas por Schaffner et al. (2003) y Becker et al. (2010).

Ciudad	Punto de vigilancia	Nº trampas por punto
Badajoz	Zona Caravanas-Parque fluvial	5
Badajoz	Estación Autobuses	3
Cáceres	Zona Caravanas-Valhondo	3
Cáceres	Estación Autobuses	4

Tabla 2: Puntos de muestreo para la vigilancia de *Aedes albopictus* (mosquito tigre) en Badajoz y en Cáceres.

B. Evaluación de la sangre ingerida por mosquitos (preferencias hemáticas)

La identificación de la sangre contenida en estos insectos es útil para obtener información sobre las preferencias de alimentación y sobre los posibles reservorios de las enfermedades transmitidas por estos vectores. Solo las hembras con sangre abdominal visible se han analizado mediante una PCR, amplificando un fragmento de 359 pares de bases del gen de vertebrados citocromo b (cyt b).

C. Sistema especial de vigilancia especial de *Aedes albopictus* (mosquito tigre) y puntos de muestreo

La rápida expansión de *Ae. albopictus* en España desde su detección por primera vez en Cataluña en 2004 (Aranda et al., 2006), ha demostrado su alta capacidad de dispersión y adaptación a diferentes ecosistemas. Se ha observado, que una de las principales vías de difusión de este mosquito es a través de turismo o vehículos pesados de

transporte de mercancías, ya que su autonomía de vuelo es corta (menos de 150–200m) (Eritja et al., 2017). Además, los mosquitos del género *Aedes* prefieren poner los huevos en pequeñas zonas que se inundan periódicamente. Por tanto, teniendo en cuenta todas estas premisas, la elección de los puntos de muestreo y colocación de las trampas se distribuyó como aparece en la Tabla 2.

En total, se muestrearon cuatro puntos en Extremadura, dos por cada ciudad (Tabla 2), entre los meses de mayo a noviembre de 2021, coincidiendo estos meses con los de mayor actividad vectorial. El número total de ovitrampas en los cuatro puntos de muestreo fue de 13, que cada 15 días se fueron revisando y cambiando

GÉNERO	ESPECIE	NÚMERO TOTAL
<i>Aedes</i>	<i>Ae. berlandi</i>	9
	<i>Ae. caspius</i>	130
	<i>Ae. echinus</i>	5 (+ 1 huevo)
	<i>Ae. pulcritarsis</i>	8
	<i>Ae. vexans</i>	15
	<i>Ae. vittatus</i>	1
	<i>Aedes</i> sp.	2
	<i>Ae. albopictus</i>	51 huevos
<i>Anopheles</i>	<i>An. maculipennis</i> s.l.	55
<i>Culiseta</i>	<i>Cs. annulata</i>	14
	<i>Cs. longiareolata</i>	192
	<i>Cs. subochrea</i>	14
<i>Culex</i>	<i>Cx. europaeus</i>	4
	<i>Cx. hortensis hortensis</i>	9
	<i>Cx. lateralis</i>	6
	<i>Cx. pipiens</i> s.l.	7138
	<i>Cx. theileri</i>	677
	Subgrupo <i>Univittatus</i>	18
	<i>Culex</i> sp.	1
	TOTAL	8298

Tabla 3: Distribución de los distintos géneros y especies de mosquitos capturados en las ciudades de Badajoz y Cáceres entre mayo de 2021 y abril de 2022.

las maderas que llevan para la puesta de huevos, por lo que el número total de tabillas de madera analizadas a lo largo de los meses fue de 168.

Resultados y discusión

Análisis global y composición faunística

Se han capturado un total de 8298 mosquitos adultos y 52 huevos de la familia *Culicidae*, correspondientes a 4 géneros y 18 especies diferentes.

Del total de mosquitos adultos, el 0,67% (n = 56) pertenecieron al género *Anopheles*; el 2,03% (n = 168) pertenecieron al género *Aedes*; el 2,63% (n = 218) a *Culiseta* y el 94,50% (n = 7835) al género *Culex*.

Culex pipiens s.l. fue la especie más abundante (86%), seguida de *Culex theileri* (8,16%), *Culiseta longiareolata* (2,31%), *Aedes caspius* (1,57%) y *Anopheles maculipennis s.l.* (0,66%). La distribución del número de mosquitos según las especies identificadas está reflejada en la Tabla 3.

Es interesante destacar la presencia de algunas especies que son importantes vectores de patógenos. Así, llama la atención la presencia de 18 ejemplares del Subgrupo *Univittatus* (*Culex univittatus/perexiguus*), que, según diversos estudios, se sabe que son altamente competentes en la transmisión de flavivirus, como el virus del Nilo occidental. De hecho, *Cx. perexiguus* fue el principal protagonista en el foco producido por esta arbovirosis que se produjo en Andalucía y Extremadura en el verano de 2020.

Especies de culicidos	Badajoz	Cáceres
<i>Ae. albopictus</i>		X
<i>Ae. berlandi</i>	X	X
<i>Ae. caspius</i>	X	X
<i>Ae. echinus</i>	X	X
<i>Ae. pulcritarsis</i>	X	
<i>Ae. vexans</i>	X	X
<i>Ae. vittatus</i>		X
<i>An. maculipennis s.l.</i>	X	X
<i>Cs. annulata</i>	X	X
<i>Cs. longiareolata</i>	X	X
<i>Cs. subochrea</i>	X	X
<i>Cx. europaeus</i>	X	X
<i>Cx. hortensis hortensis</i>		X
<i>Cx. laticinctus</i>	X	X
<i>Cx. pipiens s.l.</i>	X	X
<i>Cx. theileri</i>	X	X
Subgrupo <i>Univittatus</i>	X	X

Tabla 4: Lista de especies de mosquitos identificadas por ciudades

Distribución de especies de mosquitos por ciudades

De un total de 17 especies identificadas, en la ciudad de Badajoz se han detectado 14 especies y en Cáceres, 16 (Tabla 4).

De todas ellas, *Ae. vexans*, *Ae. vittatus*, *Ae. albopictus*, *Cx. europaeus*, *Cx. laticinctus* y *Cs. subochrea* son el primer registro para el municipio de Cáceres, y *Ae. pulcritarsis*, *Cx. europaeus* y *Cx. laticinctus* lo son para el municipio de Badajoz.

En ambas ciudades se han detectado los principales vectores del virus del Nilo (*Cx. pipiens* y especies del Subgrupo *Univittatus*).

En la Figura 6 y Figura 7, se puede observar la distribución de las

especies de mosquitos en cada ciudad y la presencia en todos los puntos de la especie del mosquito común *Cx. pipiens*.

Análisis de densidad por ciudad

Hay que tener en cuenta que se colocaron distinto número y tipo de trampas en ambas ciudades, por lo que los resultados totales globales no son adecuados para comparar densidades entre las mismas. Para solventar este sesgo y conocer realmente la comparativa de densidad de mosquitos entre Badajoz y Cáceres, se han seleccionado, entre mayo y noviembre de 2021 (época de mayor densidad de mosquitos), el mis-



Figura 6: Distribución de especies de mosquitos identificadas en los diferentes puntos de muestreo de la ciudad de Badajoz. Aquellas especies de interés vectorial de flavivirus se han marcado en negro.



Figura 7: Distribución de especies de mosquitos identificadas en los diferentes puntos de muestreo de la ciudad de Cáceres. Aquellas especies de interés vectorial de flavivirus se han marcado en negro.

salud pública y medio ambiente

Localización	Punto de muestreo	Trampas	Nº total por punto de muestreo	Nº total por ciudad
Badajoz	Azud	1 CDC + 1 BG	590	3169
	Parque Castelar	1 CDC + 1 BG	110	
	Universidad	1 CDC + 1 BG	483	
	Parque fluvial	1 CDC + 1 BG	617	
	Unión Rivillas-Calamón	1 BG	1369	
Cáceres	Parque del Príncipe	1 CDC + 1 BG	181	734
	Universidad	1 CDC + 1 BG	250	
	Hospital San Pedro de Alcántara	1 CDC + 1 BG	88	
	Parque Valhondo	1 CDC + 1 BG	63	
	Parque Pacífico	1 BG	152	

Tabla 5: Número de mosquitos capturados en los puntos de muestreo fijos y el número y tipo de trampas utilizado en Badajoz y Cáceres.

mo número de puntos de muestreo con el mismo número y tipo de trampas en ambas ciudades. En concreto, en la Tabla 5 se pueden ver qué puntos y qué trampas se tuvieron en cuenta para valorar la densidad en cada ciudad, así como el número de mosquitos capturados en cada uno de dichos puntos.

El análisis de estos resultados evidencia mayores capturas en la ciudad de Badajoz que en la de Cáceres. En total, en Badajoz, en los 5 puntos seleccionados se capturaron 3169 mosquitos, lo que supone un número algo más de 4 veces superior al de mosquitos capturados en los cinco puntos de Cáceres. Sin lugar a duda, la presencia del río Guadiana y sus áreas inundadas, así como los canales que atraviesan la ciudad de Badajoz, le confiere unas características muy adecuadas para la cría de larvas de mosquitos, hecho que no se presenta en Cáceres, con menores posibilidades de masas de agua para su cría.

Análisis según temporalidad

Al igual que se mencionó en el análisis de los resultados según las ciudades de muestreo, al estudiar la evolución de los mosquitos a lo largo del año, se seleccionaron aquellos puntos de muestreo fijos durante todo el periodo de estudio. Al analizar el mismo número de puntos de muestreo y el mismo número de trampas en cada mes del año, se puede obtener una representación comparable de forma estacional. De esta forma, la representación gráfica de la evolución anual se refleja en la Figura 8.

Como se puede observar en la gráfica, en todos los meses del año, incluidos los más fríos, pudieron capturarse mosquitos, si bien hay diferencias

notables entre ellos. El mes con menor número de capturas fue el de enero, con solamente 8 ejemplares capturados entre la suma de todas las trampas analizadas, mientras que el de mayor densidad de mosquitos parece ser el mes de julio, con 782 individuos capturados. Aparentemente, parece que en las dos ciudades extremeñas se mantiene un nivel elevado de estos insectos entre mayo y octubre, aunque ya en febrero empieza a notarse un incremento en el número de estos vectores, que se mantiene hasta incluso noviembre y, en menor medida diciembre.

Es importante mencionar que hubo una bajada brusca de mosqui-

tos en el mes de agosto. Este descenso poblacional y de densidad fue debido a la ola de calor que aconteció en el verano de 2021, alcanzándose récords históricos de temperatura de hasta 47 °C en nuestra región. Según varios estudios, las altas temperaturas, por encima de 42 °C, impiden la supervivencia de estos insectos adultos, al igual que produce la reducción de puntos de cría por evaporación del agua. Posiblemente estas altísimas temperaturas alcanzadas este mes provocaron una reducción drástica de las poblaciones adultas de mosquitos en nuestra región, que se vieron reflejadas en un número muy reducido de capturas, a pesar de que, tradicionalmente suele ser un mes con abundantes densidades, según han comprobado los mismos autores del presente trabajo, realizados en las zonas más rurales de la región.

Análisis según sexo y estado gonotrófico de los mosquitos

Del total de mosquitos adultos capturados, el 89,15% resultaron ser hembras (n = 7398) y el 10,85% correspondieron a machos (n = 900) (Figura 9). Dentro de las hembras, se capturaron en



Figura 8: Evolución temporal del número de mosquitos capturados en distintos puntos de muestreo de las ciudades de Cáceres y Badajoz (n=5200).

diferentes estados gonotróficos, de tal forma que 1633 ejemplares estaban en estado grávido, es decir, con huevos (19,68% de las hembras); 98 presentaban sangre en su abdomen (1,18%) y el resto (n = 6567) se encontraban sin alimentar (79,14%) (Figura 10).

Evaluación de la sangre ingerida por mosquitos (preferencias hemáticas)

De los 98 mosquitos analizados que presentaban sangre en su abdomen, hasta el momento se ha podido obtener información genética de la sangre contenida en 23 ejemplares (Tabla 6).

La especie de mosquito más frecuentemente observada con sangre ha sido *Cx. pipiens*, y los hospedadores de los que más se han alimentado han sido las aves, en este caso, se ha detectado sangre procedente de hasta 11 especies de aves distintas. La única especie de mosquitos donde se ha detectado sangre humana ha sido en la especie *Ae. echinus*, conocida por su preferencia trófica a partir de humanos.

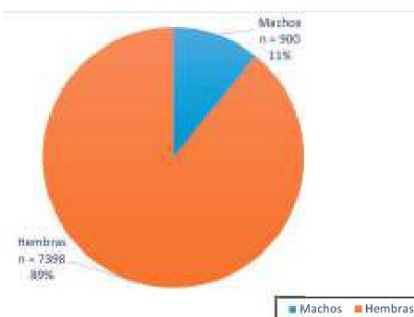


Figura 9: Número y porcentaje de machos y hembras del total de mosquitos capturados.



Figura 10: Porcentaje de hembras, según su estado de ciclo gonotrófico en el momento de la captura.

Resultado de la vigilancia de *Aedes albopictus* (mosquito tigre)

La vigilancia de *Ae. albopictus* (mosquito tigre) se efectuó desde el 4 de mayo y el 27 de noviembre de 2021, y el análisis de un total de 168 tablillas recogidas de las trampas de oviposición, permitió detectar huevos del género *Aedes* (Tabla 7) en dos de las mismas. De las dos tablillas con presencia de huevos, una de ellas resultó ser positiva a la especie *Ae. albopictus* y la otra tablilla fue positiva a la especie *Ae. echinus* (Tabla 7). La tablilla positiva al mosquito tigre fue recogida el 9 de septiembre de 2021, situada en el entorno de la estación de autobuses de Cáceres, y cercana a una zona ajardinada (Figura 11). Esta es la primera vez que se detectan huevos de esta especie invasora en la ciudad de Cáceres. El número de huevos observado fue de 51 en esta trampa de oviposición. Sin embargo, es importante mencionar que, todas las trampas de adultos colocadas en esta zona (BG-Sentinel con los atrayentes BG-Lure y CO2) tras la observación de los huevos y su confirmación como mosquito tigre en el laboratorio (Figura 12), no permitió evidenciar ningún ejemplar en fase adulta, por lo que, a priori, es de sospechar que no había una población de adultos establecida en la zona y las trampas no estaban sirviendo como foco larvario activo de esta especie. También fueron negativas todas las prospecciones directas de posibles puntos de cría larvaria en la zona. Por todo ello, los investigadores sospechan que este hallazgo de huevos pudo deberse a algún ejemplar aislado de hembra de mosquito tigre en estado grávido, que fue vehiculado en algún autobús procedente de

Ciudad	Especie mosquito	Especie hospedador procedencia sangre	Nombre científico hospedador	Nº veces detectado (hospedador)
Badajoz	<i>Cx. pipiens</i> s.l.	Ánsar chico	<i>Anser erythropus</i>	2
Badajoz	<i>Cx. pipiens</i> s.l.	Ruisenar bastardo	<i>Certhia celtif</i>	2
Badajoz	<i>Cx. pipiens</i> s.l.	Verderón europeo	<i>Chloris chloris</i>	1
Badajoz	<i>Cx. pipiens</i> s.l.	Paloma torcaz	<i>Columba palumbus</i>	1
Badajoz	<i>Cx. pipiens</i> s.l.	Curnica cabecinegra	<i>Curnica melanocephala</i>	1
Badajoz	<i>Cx. pipiens</i> s.l.	Avión común	<i>Delichon urbicum</i>	1
Badajoz	<i>Cx. pipiens</i> s.l.	Avetorillo común	<i>Acrobrychus minutus</i>	1
Badajoz	<i>Cx. pipiens</i> s.l.	Urraca común	<i>Pica pica</i>	2
Badajoz	<i>Cx. pipiens</i> s.l.	Canario silvestre	<i>Serinus canarius</i>	1
Badajoz	<i>Cx. pipiens</i> s.l.	Mirlo común	<i>Turdus merula</i>	6
Cáceres	<i>Cx. pipiens</i> s.l.	Mirlo común	<i>Turdus merula</i>	2
Cáceres	<i>Cx. pipiens</i> s.l.	Verderón europeo	<i>Chloris chloris</i>	1
Cáceres	<i>Cx. pipiens</i> s.l.	Curnica cabecinegra	<i>Sylvia melanocephala</i>	1
Cáceres	<i>Ae. echinus</i>	Humano	<i>Homo sapiens sapiens</i>	1

Tabla 6: Relación entre mosquitos identificados y procedencia de la sangre aislada, según la ciudad de hallazgo.



Figura 12: Huevo y adulto de *Aedes albopictus* eclosionado en condiciones de laboratorio.



Ciudad	Punto muestreo	Fecha	Huevos	Larvas	Machos	Hembras	Identificación
Cáceres	Zona Caravanas	11/08/2021	1				<i>Ae. echinus</i>
Cáceres	Estación autobuses	09/09/2021	51	2	1	1	<i>Ae. albopictus</i>

Tabla 7: Información sobre los puntos de muestreo donde se detectaron huevos del género *Aedes* sp

alguna zona endémica y que “desembarcó” en Cáceres y puso sus huevos en la trampa atrayente colocada en la estación.

Conclusiones

1- *Culex pipiens* es la especie con mayores densidades y distribución en ambas ciudades analizadas.

2- Se constata una amplia diversidad de mosquitos, con 17 especies detectadas, en zonas urbanas de Extremadura.

3- Se registran por primera vez *Ae. vexans*, *Ae. vittatus*, *Ae. albopictus*, *Cx. europaeus*, *Cx. laticinctus* y *Cs. subochrea* en el municipio de Cáceres, y *Ae. pulcritarsis*, *Cx. europaeus* y *Cx. laticinctus* en Badajoz.

4- Se detectan por primera vez, en las ciudades de Badajoz y Cáceres, especies del subgrupo *Univittatus*,

principales vectores del virus del Nilo en nuestro país.

5- Se detectan por primera vez huevos de *Aedes albopictus* (mosquito tigre) en la ciudad de Cáceres.

Agradecimientos

Este estudio se ha financiado gracias al Colegio Oficial de Veterinarios de Badajoz, a través del convenio con la UEX con Ref. 013/21. A los Ayuntamientos de Badajoz y de Cáceres, por las facilidades ofrecidas para el desarrollo del proyecto. A los alumnos internos de la unidad de Parasitología de la Facultad de Veteri-

naria de la UEX, por su ayuda en los trabajos de campo. Al equipo de microbiología del Hospital San Pedro de Alcántara, en especial a Guadalupe, a Rosa y a Juani, por la donación reiterada de hielo seco para su uso como cebo en las trampas de captura.

Para más información:

En el Colegio Oficial de Veterinarios de Badajoz, se podrá consultar la bibliografía completa correspondiente a este artículo para todos aquellos interesados.

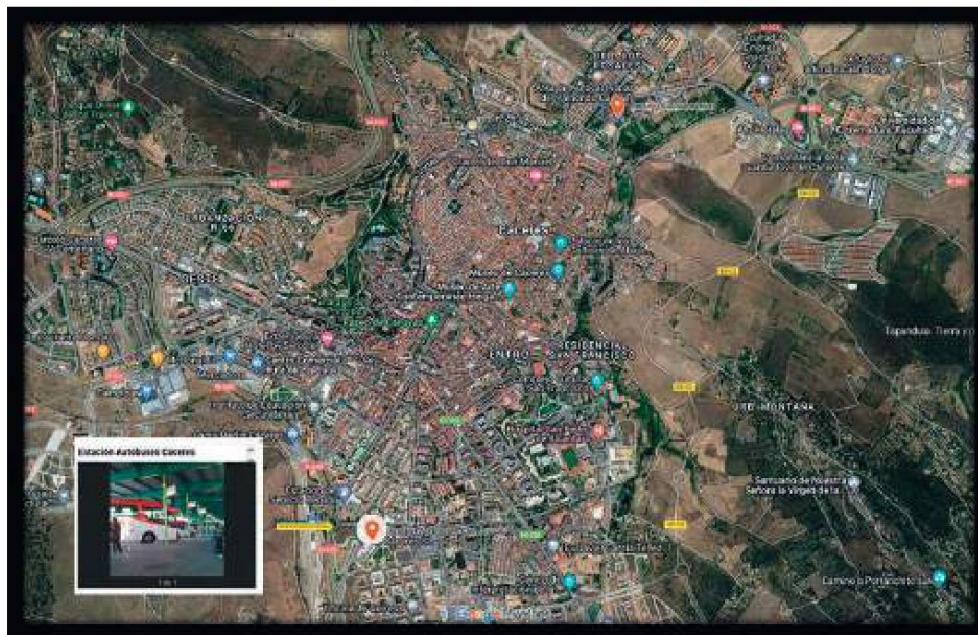
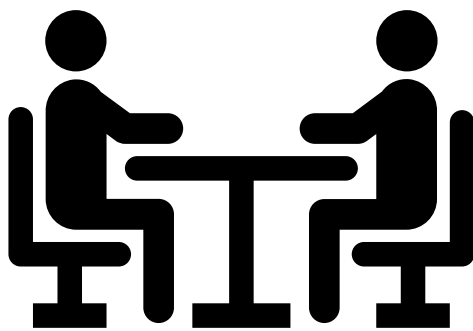


Figura 11: Mapa de la ciudad de Cáceres con la localización de la trampa de oviposición con presencia de huevos de *Aedes albopictus*. Mapa de satélite proveniente de Google Earth.

DISCUSIÓN



7. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio integral que se lleva a cabo para observar la circulación de flavivirus en varios eslabones de la cadena epidemiológica en la región de Extremadura. En el caso de los équidos, la seroprevalencia total de VNO obtenida fue del 19,7%. Esta seroprevalencia es mucho mayor que las conocidas hasta esta fecha en estudios similares realizados en diferentes zonas de España. Así, nuestros datos son más elevados que el 8,3% obtenido entre caballos salvajes en Huelva entre los años 2005 y 2008 (Jiménez-Clavero et al., 2010), el 7,1% obtenido en équidos en diferentes provincias de Andalucía algunos años más tarde (García-Bocanegra, Jaén-Téllez, et al., 2012), el 6,6% observado en équidos en Baleares (Vanhomwegen et al., 2017), o el 1,35% obtenido entre 2011 y 2013 por Abad-Cobo et al. (2017) en caballos en regiones del centro de España. Lo mismo ocurre al comparar con otros países europeos, teniendo en cuenta el 3% de seroprevalencia obtenida por Barros et al. (2011) en Portugal, el 8,5% obtenido en el sur de Francia (Durand et al., 2002), el 3,43% obtenido en Croacia (Barbić et al., 2012) o el 0,78% en el Norte de Italia (Pierro et al., 2013). Sin embargo, esta seroprevalencia se aproxima más a las observadas en otros países africanos de la cuenca mediterránea, como el 31,1% en équidos de Marruecos (Benjelloun et al., 2017) o el 17,4% en Argelia (Lafri et al., 2017). Cabe señalar que nuestro estudio fue desarrollado entre los años 2018 y 2019, y que el año 2018 fue considerado por el ECDC como una de las temporadas más cruentas y con mayor número de casos notificados en Europa, tanto en animales como en seres humanos (ECDC, 2018). Esta situación se confirma con los resultados de seroprevalencia obtenidos en otros países europeos en fechas posteriores, como, por ejemplo, Alemania, donde obtuvieron un 13,77% en 2020 (Bergmann et al., 2022).

En cuanto a lo observado con el VUSU, nuestro estudio arrojó una seroprevalencia del 1,52% en équidos. Este valor coincide con los datos de los que disponemos hasta el momento en otras zonas con respecto a este flavivirus, aunque son escasos. Así, observamos un 1,2% en caballos muestreados en las islas Baleares (Vanhomwegen et al., 2017) o un 2,9% en Croacia (Barbic et al., 2013). Sin embargo, en países como Italia o Polonia se han registrado seroprevalencias mucho mayores; 89,2% en 2008 y 7,8% en 2009 en Italia (Savini et al., 2011) o un 27,98% en Polonia (Bazanów et al., 2018). Estos valores de seroprevalencias del VUSU suelen ser menores que los observados en el caso del VNO, y podría deberse a que los équidos son menos susceptibles al VUSU (Clé et al., 2019), y eso implica que los títulos de anticuerpos que son inducidos por este flavivirus sean menores (Hassine et al., 2014). No obstante, estas menores prevalencias podrían explicarse también por el hecho de que no existe un método de detección serológico específico frente al VUSU, utilizándose aquellos kits de ELISA preparados para la detección de anticuerpos frente al VNO, obteniendo resultados positivos frente al VUSU debido a las reacciones cruzadas entre estos flavivirus, y de ahí también la necesidad de

confirmar los resultados mediante la técnica VNT. Por tanto, creemos que los niveles de seroprevalencia observados para el VUSU seguramente están infravalorados y realmente sean bastante mayores que los obtenidos en el presente estudio.

De los 13 équidos que presentaron sintomatología o sospecha de enfermedad aguda por VNO, cinco presentaron anticuerpos específicos IgM y cuatro fueron IgG positivos, confirmando positividad por VNT en ocho de ellos. Uno de estos animales sintomáticos murió y se confirmó que el linaje 1 estaba implicado en la infección. Estos resultados concuerdan con los casos de VNO notificados en España, ya que, hasta la fecha, el linaje 1 es el único que ha estado implicado en équidos (García San Miguel et al., 2020), a pesar de que el linaje 2 ha sido identificado en Europa en varias ocasiones, aunque solo en aves, seres humanos y en mosquitos (Bakonyi et al., 2006; Savini et al., 2012; Papa et al., 2013; Christova et al., 2020). En nuestro país, el linaje 2 ha sido detectado solo en aves en Cataluña (Busquets et al., 2019), así como una rama evolutiva del linaje 4 en mosquitos (Vázquez et al., 2010).

Al estudiar los factores de riesgo implicados en la presencia de VNO en los équidos, parece que la edad es uno de los factores más importantes, encontrando mayores seroprevalencias en animales de mayor edad que en los jóvenes, hecho que concuerda con otros estudios similares (Hubálek et al. 2014). Lo mismo ocurre con la capa del animal, presentando un mayor riesgo los animales de capas claras que los animales de capas oscuras. Esto puede ser debido a que *Culex* spp. suele ser atraído más por los colores claros porque la luz en los animales de este color produce mayor reflejo que en los animales de color oscuro haciendo que estos sean más atractivos para los vectores (Wen et al., 1997; Kim et al., 2021). En el caso del VUSU se ha observado como factor de mayor riesgo determinadas razas como la pura sangre inglés o la pura raza árabe, probablemente por sus hábitos de entrenamiento y de práctica de cría, en la cual es más habitual que estas razas estén más horas al aire libre y, por tanto, hay más probabilidad de contacto con el vector (Selim et al., 2021).

En el caso de las seroprevalencias observadas en aves procedentes de dos centros de recuperación extremeños, este valor fue del 18,23% para el VNO y del 1,04% para el VUSU, mientras que todas las aves fueron negativas para el VBAG, un virus con escasos reportes en nuestro país, pero responsable de un brote con mortalidad elevada en aves de cazas en el sur de Andalucía (Agüero et al., 2011). Es de destacar los resultados positivos en animales menores de un año, lo que indica una circulación activa del VNO en Extremadura. Estos datos frente al VNO son más elevados que los observados en otros trabajos, como el 2,2% obtenido por López et al. (2011) en aves de centros de recuperación en el sur de España o el 2,8% obtenido en EE. UU. (Randall et al., 2012). Es cierto que estas aves presentaban algún tipo de sintomatología, entre ellas patologías como politraumatismos causados por accidentes de tráfico o por armas de fuego, así como desorientación o estupor u otro tipo de sintomatología nerviosa. Por tanto,

podría haber un cierto sesgo de los resultados si los comparamos con los obtenidos en aves silvestres sanas. Entre estas aves, 14 de ellas presentaban sintomatología nerviosa compatible con los signos presentados en las infecciones ocasionadas por flavivirus. En todas ellas, se confirmó la presencia del VNO, tanto mediante serología como mediante el VNT. Todas ellas acabaron falleciendo, por lo que durante la necropsia se recogieron muestras de tejidos de diferentes órganos para realizar RT-PCR y en 3 de ellas se aisló el linaje 1 del VNO. Cabe señalar que estas tres muestras pertenecían a mochuelos europeos (*Aethene noctua*), siendo la primera vez que se detectaba este linaje en esta especie aviar, aunque es conocido su presencia en otras muchas especies de aves (Figuerola et al., 2007; Höfle et al., 2008). Como factores de riesgo asociados a la presencia de VNO en estas aves, al igual que ocurría en el caso de los équidos, se encuentra la edad, siendo mayor en individuos adultos que en juveniles, ya que estos animales han tenido más tiempo para contactar con los vectores y por lo tanto aumenta la probabilidad de infección con flavivirus (Martínez-De La Puente et al., 2018). Del mismo modo que en caballos, el color también parece ser un factor de riesgo, apareciendo mayores niveles de seroprevalencia en aves de colores claros que en colores oscuros, hecho que también se ha observado en otros estudios similares (Yan et al., 2017).

Este estudio también incluyó el análisis de aves aparentemente sanas del grupo de los passeriformes, cuyo hábitat eran zonas urbanas y periurbanas de Extremadura y así poder conocer la situación epidemiológica de las mismas. Nos centramos en especies de aves del orden Passeriformes porque son el grupo más numeroso en zonas urbanas y periurbanas y están en contacto muy estrecho con poblaciones humanas y equinas. Tras los análisis pertinentes, finalmente se obtuvo una seroprevalencia global del 3,1% para el VNO y del 0,16% para el VUSU. Estos datos de aves sanas en Extremadura son menores que los resultados obtenidos en otros países europeos, como el 4,8% observado en Francia (Jourdain et al., 2007), el 12,7% en Croacia (Vilibic-Cavlek et al., 2019b), el 7,6% en Serbia (Vilibic-Cavlek, et al., 2019a), el 5,9% en la República Checa (Hubálek, 2008) o el 4,29% en Italia (Llopis et al., 2015). Si comparamos nuestros datos con los observados en otras zonas de España, se observaron seroprevalencias más bajas en distintas regiones de Andalucía, como el 0,38% de Ferraguti et al. (2016), el 0,67%, detectado por Jurado-Tarifa et al. (2016) o el 1% de García-Bocanegra et al. (2011a). En Cataluña se obtuvieron también seroprevalencias más bajas, como el 1,47% en aves nativas (Alba et al., 2014). En el año 2008 se publicaron 2 estudios en Andalucía, donde se observaron seroprevalencias más elevadas que las de nuestro estudio, especialmente en aves migratorias (7,5% y 5,23% en estudios de López et al. (2008) y Figuerola et al., (2008), respectivamente).

Estos valores de seroprevalencia en aves sanas son muchos menores que los obtenidos en las aves procedentes de los centros de recuperación, posiblemente como ya comentamos con anterioridad, por el sesgo que supone analizar animales ya

enfermos, muchos de ellos con sintomatología nerviosa compatible con infección por VNO o VUSU. Además, según algunos autores Hubálek et al. (2014), aquellas aves infectadas por flavivirus suelen tener menor actividad y, por tanto, es menos probable que caigan en las redes utilizadas para su captura, por lo que también podría haber un sesgo en dichas capturas. A pesar de estas limitaciones, y al igual que se observó en los équidos, en Extremadura se confirma una clara circulación vírica del VNO entre las aves silvestres, y del VUSU por primera vez en esta región.

En vista de los resultados observados en la vigilancia activa de los hospedadores vertebrados del VNO y del VUSU, parecía que el siguiente paso necesario debía ser instaurar una vigilancia entomológica en estas zonas. Por un lado, se realizó una vigilancia entomológica en zonas rurales, coincidentes con los puntos de muestreos donde se realizaron las extracciones de muestras de sangre en équidos y en aves entre los meses de abril de a noviembre de 2018. Se colocaron dos tipos de trampas (CDC y BG–Sentinel), en 7 localidades de la provincia de Cáceres y en 11 localidades de la provincia de Badajoz. Aunque este estudio está pendiente de ser publicado, se han analizado más de 13000 mosquitos pertenecientes a 16 especies, *Aedes berlandi*, *Ae. caspius* s.l., *Aedes echinus*, *Aedes geniculatus*, *Ae. vexans*, *An. atroparvus*, *An. maculipennis* s.l., *An. maculipennis* s.s., *Cs. annulata*, *Cs. longiareolata*, *Cs. subochrea*, *Cx. hortensis*, *Cx. pipiens* s.l., *Cx. theileri*, *Cx. perexiguus* y *Cx. univittatus*. El análisis de 643 grupos de mosquitos mediante RT-PCR ha permitido detectar varios grupos de mosquitos positivos al VNO, en concreto ARN del linaje 1 en mosquitos de la especie *Cx. pipiens* y del subgrupo *Univittatus*, y también 13 grupos de mosquitos positivos a VUSU en esas mismas especies. Esta sería la primera vez que se detecta la presencia del linaje 1 del VNO en mosquitos en Extremadura, a pesar de que ya ha sido detectado en el sur de España en mosquitos *Cx. perexiguus* (Vázquez et al., 2011b).

En años más recientes, en concreto en la temporada 2020-2021 se realizó un nuevo muestreo de mosquitos y aves en las mismas zonas de áreas periurbanas de la ciudad de Badajoz, donde se había detectado ambos flavivirus en caballos en áreas periféricas. Este estudio permitió detectar, por primera vez en España, el linaje África 3 del VUSU en mosquitos de la especie *Cx. pipiens*. Este linaje ya había sido detectado en mosquitos en Uganda (Mossel et al., 2017), Israel (Mannasse et al., 2017) y en el sur de Francia (Eiden et al., 2018; Constant et al., 2022). También ha sido detectado en *Turdus merula* en Alemania, Bélgica (Cadar et al., 2017), Francia (Eiden et al., 2018), Austria (Weidinger et al., 2020), República Checa (Hönig et al., 2019), Holanda (Oude Munnink et al., 2020; Giglia et al., 2021), Reino Unido (Folly et al., 2020) y Luxemburgo (Snoeck et al., 2022). Por tanto, se corrobora la importancia de nuestra región como hábitats idóneos para numerosas aves migratorias y, por tanto, del riesgo de establecimiento y de circulación endémica de estos virus en las poblaciones residentes. Precisamente, la seroprevalencia obtenida en las aves capturadas en estas áreas periurbanas en los años 2020 y 2021 fue del 1,2% frente al VUSU, destacando que el 75% de las aves muestreadas eran residentes

locales y muchos individuos juveniles resultaron seropositivos, lo que sugiere que existe una circulación activa del VUSU en dichas áreas, al igual que lo observado en el caso del VNO, por lo que parece que existe una co-circulación de ambos flavivirus en la región extremeña y en los mismos vectores (Busquets et al., 2008; Vázquez et al., 2011a; Zannoli & Sambri, 2019; Bravo-Barriga, et al., 2021a; Guerrero-Carvajal et al., 2021; Napp et al., 2021; Santos et al., 2022) . Tal y como han demostrado estudios recientes (Casades-Martí et al., 2023), la presencia de aves en zonas cercanas a núcleos urbanos o estables incrementa el riesgo de infección por estos flavivirus ya que podría incrementar el número de vectores competentes infectados. Por lo tanto, sería altamente recomendable que el VUSU sea incluido en los programas de vigilancia y de los diagnósticos diferenciales en el caso de enfermedades neurológicas, tanto en seres humanos como en équidos.

Avanzamos más en estudios entomológicos dirigiéndolos a zonas urbanas propiamente dichas, en concreto en parques y jardines de las ciudades de Cáceres y Badajoz. Los estudios de vigilancia de vectores evidenciaron una clara abundancia de *Cx. pipiens*, representando el 86% de las capturas del total de mosquitos. Esta especie es muy cosmopolita y la más abundante y ampliamente distribuida tanto en Extremadura como por el resto de España (Bueno-Marí et al., 2012; Bravo-Barriga et al., 2016). Además, también se detectó la presencia por primera vez en zonas urbanas, de ejemplares del subgrupo *Univittatus*, *Cx. univittatus* y *Cx. perexiguus*. Estas tres especies son altamente competentes en la transmisión del VNO y VUSU (Mixão et al., 2016), si bien parece que *Cx. perexiguus* tiene mayor predilección por ambientes rurales, principalmente por humedales (Roiz et al., 2015). También se registran por primera vez *Ae. vexans*, *Ae. vittatus*, *Ae. albopictus*, *Cx. europaeus*, *Cx. laticinctus* y *Cs. subochrea* en el municipio de Cáceres, mientras que en Badajoz lo hacen *Ae. pulcritarsis*, *Cx. europaeus* y *Cx. laticinctus* (Bueno-Marí et al., 2012; Bravo-Barriga et al., 2016), siendo necesarios estos estudios entomológicos para ampliar el conocimiento de los posibles vectores que puede haber en zonas urbanas, así como sus densidades. Además, se detecta también por primera vez huevos de *Ae. albopictus* (mosquito tigre) en la estación de autobuses de la ciudad de Cáceres, ampliándose los municipios donde se ha detectado esta especie invasora desde 2018 en Extremadura (Bravo-Barriga et al., 2019). Esta especie, *Ae. albopictus*, es posible que en un corto espacio de tiempo se establezca y es un riesgo no solo por las molestias que ocasiona y que es vector de otros virus importantes, sino que puede ser posible vector secundario de VNO (de Wispelaere et al., 2017).

Afortunadamente, ninguno de los grupos de mosquitos analizados mediante RT-PCR fue positivo para flavivirus en zonas estrictamente urbanas (datos no publicados), aunque es necesario mantener la vigilancia en las diferentes temporadas, debido a que son zonas de riesgo, al coexistir vectores competentes y hospedadores susceptibles y amplificadores del virus (aves).

La gran densidad de aves de la región extremeña (abundantes zonas ZEPA), la gran cabaña de équidos existente, la presencia de los vectores de flavivirus en todos los hábitats muestreados, así como las concentraciones de agua (región de España con el mayor número de kilómetros de costa de agua dulce) y las favorables temperaturas estivales, son factores que contribuyen a hacer de esta región una de las de mayor riesgo de infección por estos arbovirus, como así se ha demostrado durante la vigilancia activa desarrollada en este trabajo. Así mismo, y debido a que existe una circulación activa, es importante incluir tanto al VNO como al VUSU en los diagnósticos diferenciales de aquellas personas y équidos que padezcan enfermedades con sintomatología nerviosa en las épocas en las que el vector se encuentra activo. Creemos conveniente destacar la necesidad de mantener la revacunación en los équidos de esta región, ya que tan sólo el 5,25% de los animales muestreados estaban vacunados en el momento de realizar la vigilancia en este trabajo (2018-2019). Tras el brote de VNO acontecido en nuestro país en el año 2020, los procesos de vacunación se dispararon en équidos, si bien, como ya hemos mencionado, sería importante realizar la revacunación anual con el fin de mantener el estatus inmunitario favorable frente al VNO en estos animales cada año.

La alta prevalencia en muchas especies de aves y los niveles de infectividad en los mosquitos hace que sea necesario una vigilancia activa en aves, así como establecer un mecanismo de alerta temprana para poder, varias semanas antes de que se produzca un brote, reforzar el control de mosquitos, reducir la posible circulación del virus y evitar que se contagie a los humanos.

CONCLUSIONES



8. CONCLUSIONES

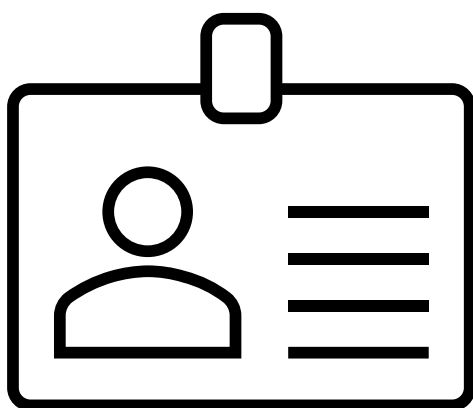
En base a los resultados obtenidos, se han extraído las siguientes conclusiones relevantes:

1. Se ha detectado una alta seroprevalencia del virus del Nilo occidental en équidos de Extremadura, tanto individualmente (19,72%), como a nivel de rebaño (63,77%), lo que demuestra la necesidad de promulgar la vacunación y revacunación anual de estos animales en la región extremeña.
2. La presencia de caballos con anticuerpos IgM frente al virus del Nilo occidental confirmó una circulación activa del virus en las temporadas 2018 y 2019. El linaje 1 ha sido el único detectado circulando en esta región.
3. Se evidencia una alta seroprevalencia del virus del Nilo occidental en aves enfermas llegadas a centros de recuperación de Extremadura (18,23%), durante el periodo 2017–2019, así como en aves sanas de áreas periurbanas en el año 2020 (2,55%), evidenciando el riesgo que esto supone para la Salud Pública.
4. Se detectan por primera vez caballos y aves seropositivos al virus Usutu en Extremadura, lo que indica una co-circulación con el virus del Nilo occidental y la necesidad de hacer diagnóstico diferencial para ambos flavivirus en casos de meningoencefalitis.
5. Se han detectado, por primera vez en Europa, algunas especies de aves seropositivas tanto al virus del Nilo occidental (Cigüeña negra) como al virus Usutu (avutarda común, alcaudón común, ruiseñor común y bengalí rojo), lo que supone un paso adelante en el conocimiento epidemiológico de estos arbovirus en Europa.
6. Se ha detectado una seroprevalencia del virus del Nilo occidental del 3,1% y del virus Usutu del 0,16% en áreas rurales de la provincia de Badajoz tanto en aves exóticas residentes como nativas migratorias y nativas residentes. Además, anticuerpos frente al virus del Nilo han sido evidenciados en individuos juveniles, lo cual implica una circulación activa de este virus en la región en las temporadas 2018 y 2019.
7. Se detecta por primera vez en España el linaje Africa 3 del virus Usutu en mosquitos *Culex pipiens*, indicando una circulación activa de este arbovirus en áreas cercanas a la ciudad de Badajoz, lo que debería promover la inclusión de este virus en los diagnósticos diferenciales de las meningoencefalitis humanas y animales de la zona.

8. Se constata una amplia diversidad de mosquitos en zonas urbanas y periurbanas de Extremadura, con la identificación de 18 especies englobadas en 4 géneros (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles* y *Culiseta*), siendo la especie *Culex pipiens* la más ampliamente distribuida, importante vector de flavivirus.

9. Se detectan por primera vez en los mismos hábitats de zonas urbanas de Extremadura especies del subgrupo *Univittatus* (*Culex perexiguus* y *Culex univittatus*) principales vectores del virus del Nilo occidental en el sur peninsular. Esto evidencia el posible riesgo de transmisión de esta arbovirosis en áreas urbanas y periurbanas, con una implicación elevada en la Salud pública y animal.

ANEXOS: Autorizaciones de las revistas científicas



9. ANEXOS

Autorizaciones de las revistas científicas

From: Wiley Global Permissions <permissions@wiley.com>
Sent: Monday, February 6, 2023 5:38:46 PM
To: EVA MARÍA FRONTERA CARRIÓN <frontera@unex.es>
Subject: RE: Authorization

Dear Eva,

Thank you for your email.

Permission is hereby granted for the use requested subject to the usual acknowledgements (author, title of material, title of journal, ourselves as publisher). You should also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication; this can be found on the copyright page in the journal.

Any third party material is expressly excluded from this permission. If any of the material you wish to use appears within our work with credit to another source, authorization from that source must be obtained.

This permission does not include the right to grant others permission to photocopy or otherwise reproduce this material except for accessible versions made by non-profit organizations serving the blind, visually impaired and other persons with print disabilities (VIPs).

Sincerely,

Sheik Safdar
Sales Specialist – Permissions
Global Sales Partnerships
Wiley

ssafdar@wiley.com
T +1 201-748-6512

111 River Street
Hoboken, NJ 07030-5774
U.S.
permissions@wiley.com

WILEY

Reuse My Published Work

As a Wiley author, you retain certain reuse rights when you sign your Copyright Transfer Agreement (CTA). Refer back to this agreement if you are seeking permission to:

- Republish an extract of your own published work.
- Include your article in your thesis.
- Use copies for your internal teaching purposes.

If you still require a formal permission license, please make the request through RightsLink and select "author of this Wiley work" and your appropriate reuse rights to download your license.

From: Veterinary Microbiology <vetmic@elsevier.com>
Sent: Monday, February 6, 2023 11:23:07 AM
To: EVA MARÍA FRONTERA CARRIÓN <frontera@unex.es>
Subject: Re: Authorization [230206-000440]

How was our service today?  

rntmarker_41803

Dear Dr. Frontera,

Please see the page : <https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions> As per policy, authors can use their article in their thesis/dissertation.

Can I include/use my article in my thesis/dissertation?



Yes. Authors can include their articles in full or in part in a thesis or dissertation for non-commercial purposes.

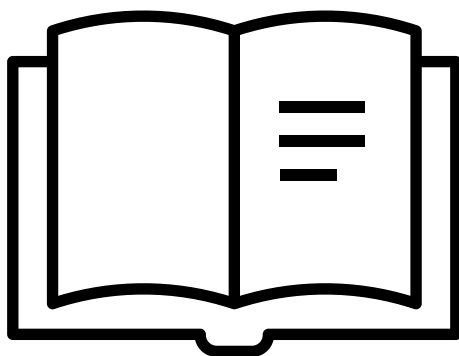
For any further clarifications, you can submit your query via our [online form](#) »

Do let me know if you have any further queries.

Many thanks and best wishes,
Shruthi

Shruthi Shankar
Journal Manager
Health and Medical Sciences
ELSEVIER | Operations | Research Content Operations
Official phone number: +9144 4299 4789

BIBLIOGRAFÍA



10. BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Cobo, A., Llorente, F., Barbero, M. del C., Cruz-López, F., Forés, P., & Jiménez-Clavero, M. (2017). Serosurvey reveals exposure to West Nile virus in asymptomatic horse populations in central Spain prior to recent disease foci. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(5), 1387–1392. <https://doi.org/10.1111/tbed.12510>
- Aberle, S. W., Kolodziejek, J., Jungbauer, C., Stiasny, K., Aberle, J. H., Zoufaly, A., Hourfar, M. K., Weidner, L., & Nowotny, N. (2018). Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. *Eurosurveillance*, 23(43), 3–8. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.43.1800545>
- Agüero, M., Fernández-Pinero, J., Buitrago, D., Sánchez, A., Elizalde, M., Miguel, E. S., Villalba, R., Llorente, F., & Jiménez-Clavero, M. Á. (2011). Bagaza virus in partridges and pheasants, Spain, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, 17(8), 1498–1501. <https://doi.org/10.3201/EID1708.110077>
- Aharonson-Raz, K., Lichter-Peled, A., Tal, S., Gelman, B., & Cohen, D. (2014). Spatial and temporal distribution of West Nile virus in horses in Israel (1997-2013)-from endemic to epidemics. *PLoS ONE*, 9(11), 113149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113149>
- Ahmadnejad, F., Otarod, V., Fallah, M. H., Lowenski, S., Sedighi-Moghaddam, R., Zavareh, A., Durand, B., Lecollinet, S., & Sabatier, P. (2011). Spread of West Nile virus in Iran: a cross-sectional serosurvey in equines, 2008-2009. *Epidemiology and Infection*, 139(10), 1587–1593. <https://doi.org/10.1017/S0950268811000173>
- Alba, A., Allepuz, A., Napp, S., Soler, M., Selga, I., Aranda, C., Casal, J., Pages, N., Hayes, E. B., & Busquets, N. (2014). Ecological surveillance for West Nile in Catalonia (Spain), learning from a five-year period of follow-up. *Zoonoses and Public Health*, 61(3), 181–191. <https://doi.org/10.1111/zph.12048>
- Albery, G. F., Becker, D. J., Brierley, L., Brook, C. E., Christofferson, R. C., Cohen, L. E., Dallas, T. A., Eskew, E. A., Fagre, A., Farrell, M. J., Glennon, E., Guth, S., Joseph, M. B., Mollentze, N., Neely, B. A., Poisot, T., Rasmussen, A. L., Ryan, S. J., Seifert, S., ... Carlson, C. J. (2021). The science of the host–virus network. *Nature Microbiology* 2021 6:12, 6(12), 1483–1492. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00999-5>
- Aliota, M. T., Jones, S. A., Dupuis, A. P., Ciota, A. T., Hubalek, Z., & Kramer, L. D. (2012). Characterization of Rabensburg virus, a flavivirus closely related to West Nile virus of the Japanese encephalitis antigenic group. *PloS One*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0039387>

- Allan, S. A., Day, J. F., & Edman, J. D. (1987). Visual ecology of biting flies perspectives and overview further annual reviews. *Annual review of entomology*, 32: 297-316. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.32.010187.001501>
- Almeida, A. P. G., Fouque, F., Launois, P., Sousa, C. A., & Silveira, H. (2017). From the Laboratory to the Field: Updating Capacity Building in Medical Entomology. *Trends in Parasitology*, 33(9), 664–668. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.05.011>
- Ana, A., Pérez Andrés, M., Julia, P., Pedro, P., Arno, W., Kimberly, V. W., Julio, A., & Michelle, W. (2017). Syndromic surveillance for West Nile virus using raptors in rehabilitation. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12917-017-1292-0/FIGURES/4>
- Anderson, J. F., & Rahal, J. J. (2002). Efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virus in vitro. *Emerging Infectious Diseases*, 8(1), 107–108. <https://doi.org/10.3201/EID0801.010252>
- Anderson, J. R., & Rico-Hesse, R. (2006). *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(5), 886–892.
- Angenvoort, J., Brault, A. C., Bowen, R. A., & Groschup, M. H. (2013). West Nile viral infection of equids. *Veterinary Microbiology*, 167(1–2), 168–180. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2013.08.013>
- Aranda, C., Alba, A., Castellà, J., Cáceres, F., Ruíz, S., Sánchez-Seco, M. P., Marqués, E., Vázquez, A., Tenorio, A., Busquets, N., Escosa, R., & Gálvez, J. C. (2008). Detection and Monitoring of Mosquito Flaviviruses in Spain between 2001 and 2005. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(2), 171–178. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0073>
- Ashraf, U., Ye, J., Ruan, X., Wan, S., Zhu, B., & Cao, S. (2015). Usutu virus: an emerging flavivirus in Europe. *Viruses*, 7(1), 219–238. <https://doi.org/10.3390/v7010219>
- Autorino, G. L., Battisti, A., Deubel, V., Ferrari, G., Forletta, R., Giovannini, A., Lelli, R., Murri, S., & Scicluna, M. T. (2002). West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 8(12), 1372–1378. <https://doi.org/10.3201/EID0812.020234>
- Avirutnan, P., Fuchs, A., Hauhart, R. E., Somnuk, P., Youn, S., Diamond, M. S., & Atkinson, J. P. (2010). Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(4), 793–806. <https://doi.org/10.1084/JEM.20092545>

- Azmi, K., Tirosh-Levy, S., Manasrah, M., Mizrahi, R., Nasereddin, A., Al-Jawabreh, A., Ereqat, S., Abdeen, Z., Lustig, Y., Gelman, B., Schwartz, G., & Steinman, A. (2017). West Nile virus: Seroprevalence in animals in Palestine and Israel. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(8), 558–566. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2090>
- Bakonyi, T., Busquets, N., & Nowotny, N. (2014). Comparison of complete genome sequences of Usutu virus strains detected in Spain, Central Europe, and Africa. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 14(5), 324. <https://doi.org/10.1089/VBZ.2013.1510>
- Bakonyi, T., Erdélyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Csörgo, T., Lussy, H., Chvala, S., Bukovsky, C., Meister, T., Weissenböck, H., & Nowotny, N. (2007). Emergence of Usutu virus in Hungary. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(12), 3870–3874. <https://doi.org/10.1128/JCM.01390-07>
- Bakonyi, T., Gould, E. A., Kolodziejek, J., Weissenböck, H., & Nowotny, N. (2004). Complete genome analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001: comparison with the South African strain SAAR-1776 and other flaviviruses. *Virology*, 328(2), 301–310. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2004.08.005>
- Bakonyi, T., & Haussig, J. M. (2020). West Nile virus keeps on moving up in Europe. *Eurosurveillance*, 25(46), 2001938. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.46.2001938/CITE/PLAINTEXT>
- Bakonyi, T., Hubálek, Z., Rudolf, I., & Nowotny, N. (2005). Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 11(2), 225–231. <https://doi.org/10.3201/EID1102.041028>
- Bakonyi, T., Ivanics, É., Erdélyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Weissenböck, H., & Nowotny, N. (2006). Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 12(4), 618–623. <https://doi.org/10.3201/EID1204.051379>
- Bakonyi, T., Jungbauer, C., Aberle, S. W., Kolodziejek, J., Dimmel, K., Stiasny, K., Allerberger, F., & Nowotny, N. (2017). Usutu virus infections among blood donors, Austria, July and August 2017 – Raising awareness for diagnostic challenges. *Eurosurveillance*, 22(41), 17–00644. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.41.17-00644/CITE/PLAINTEXT>
- Balenghien, T., Vazeille, M., Grandadam, M., Schaffner, F., Zeller, H., Reiter, P., Sabatier, P., Fouque, F., & Bicout, D. J. (2008). Vector competence of some French *Culex* and *Aedes* mosquitoes for West Nile virus. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* (Larchmont, N.Y.), 8(5), 589–595. <https://doi.org/10.1089/VBZ.2007.0266>

- Barbic, L., Gjenero-margan, I., Vilibic-cavlek, T., Listes, E., Stevanovic, V., Ljubin-sternak, S., Pem-novosel, I., Listes, I., & Mlinaric-galinovic, G. (2013). Demonstration of Usutu virus antibodies in horses, Croatia. *13*(10), 772–774. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1236>
- Barbić, L., Listeš, E., Katić, S., Stevanović, V., Madić, J., Starešina, V., Labrović, A., di Gennaro, A., & Savini, G. (2012). Spreading of West Nile virus infection in Croatia. *Veterinary Microbiology*, *159*(3–4), 504–508. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2012.04.038>
- Barrett, A. D. T. (2018). West Nile in Europe: an increasing public health problem. *Journal of Travel Medicine*, *25*(1). <https://doi.org/10.1093/JTM/TAY096>
- Barros, S. C., Ramos, F., Fagulha, T., Duarte, M., Henriques, A. M., Waap, H., Luís, T., Costa, T., Amador, R., Quintans, S., & Fevereiro, M. (2017). West Nile virus in horses during the summer and autumn seasons of 2015 and 2016, Portugal. *Veterinary Microbiology*, *212*: 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.008>
- Barros, S. C., Ramos, F., Fagulha, T., Duarte, M., Henriques, M., Luís, T., & Fevereiro, M. (2011). Serological evidence of West Nile virus circulation in Portugal. *Veterinary Microbiology*, *152*(3–4), 407–410. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2011.05.013>
- Barzon, L. (2018). Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, *107*, 38–47. <https://doi.org/10.1016/J.JCV.2018.08.007>
- Barzon, L., Pacenti, M., Cusinato, R., Cattai, M., Franchin, E., Pagni, S., Martello, T., Bressan, S., Squarzon, L., Cattelan, A. M., Pellizzer, G., Scotton, P., Beltrame, A., Gobbi, F., Bisoffi, Z., Russo, F., & Palù, G. (2011). Human cases of West Nile virus infection in northeastern Italy, 15 June to 15 November 2010. *Eurosurveillance*, *16*(33), 19949. <https://doi.org/10.2807/ESE.16.33.19949-EN/CITE/PLAINTEXT>
- Barzon, L., Pacenti, M., Franchin, E., Pagni, S., Martello, T., Cattai, M., Cusinato, R., & Palù, G. (2013). Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *208*(7), 1086–1092. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIT290>
- Barzon, L., Pacenti, M., Franchin, E., Squarzon, L., Sinigaglia, A., Ulbert, S., Cusinato, R., & Palù, G. (2014). Isolation of West Nile virus from urine samples of patients with acute infection. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(9), 3411. <https://doi.org/10.1128/JCM.01328-14>
- Bażanów, B., Jansen van Vuren, P., Szymański, P., Stygar, D., Frącka, A., Twardoń, J., Kozdrowski, R., & Pawęska, J. T. (2018). A survey on West Nile and Usutu viruses in

- horses and birds in Poland. *Viruses*, 10(2), 12–14.
<https://doi.org/10.3390/v10020087>
- Beasley, D. W. C., Holbrook, M. R., Travassos Da Rosa, A. P. A., Coffey, L., Carrara, A. S., Phillippi-Falkenstein, K., Bohm, R. P., Ratterree, M. S., Lillibridge, K. M., Ludwig, G. v., Estrada-Franco, J., Weaver, S. C., Tesh, R. B., Shope, R. E., & Barrett, A. D. T. (2004). Use of a recombinant envelope protein subunit antigen for specific serological diagnosis of West Nile virus infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2759. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2759-2765.2004>
- Beaty B.J., Calisher C.H., & Shope R.E. (1995). Lenette EH, Lenette DA, & Lenette ET, eds. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections*. Washington DC: American Public Health Association, 189-212
- Beck, C., Angel Jimenez-Clavero, M., Leblond, A. S., Durand, B. T., Nowotny, N., Leparc-Goffart, I., Phan Zientara, S., Jourdain, E., & Lecollinet, S. (2013). Flaviviruses in Europe: complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease. *International. Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 6049–6083. <https://doi.org/10.3390/ijerph10116049>
- Beck, C., Desprès, P., Paulous, S., Vanhomwegen, J., Lowenski, S., Nowotny, N., Durand, B., Garnier, A., Blaise-Boisseau, S., Guitton, E., Yamanaka, T., Zientara, S., & Lecollinet, S. (2015). A high-performance multiplex immunoassay for serodiagnosis of flavivirus-associated neurological diseases in horses. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/678084>
- Beck, C., Lowenski, S., Durand, B., Bahuon, C., Zientara, S., & Lecollinet, S. (2017). Improved reliability of serological tools for the diagnosis of West Nile fever in horses within Europe. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0005936>
- Beck, H. E., Zimmermann, N. E., McVicar, T. R., Vergopolan, N., Berg, A., & Wood, E. F. (2018). Present and future Köppen-Geiger climate classification maps at 1-km resolution. *Scientific Data* 2018 5:1, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.214>
- Becker, N., Jöst, H., Ziegler, U., Eiden, M., Höper, D., Emmerich, P., Fichet-Calvet, E., Ehichioya, D. U., Czajka, C., Gabriel, M., Hoffmann, B., Beer, M., Tenner-Racz, K., Racz, P., Günther, S., Wink, M., Bosch, S., Konrad, A., Pfeffer, M., ... Schmidt-Chanasit, J. (2012). Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. *PloS One*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0032604>
- Becker, N., Petrić, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M. B., Dahl, C., & Kaiser, A. (2020). *Mosquitoes, identification, ecology: Vol. 3th Edition*.

- Becker, N., Petrić, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., & Kaiser, A. (2010). Mosquitoes and their control: Second edition. *Mosquitoes and Their Control: Second Edition*, 1–577. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-92874-4/COVER>
- Benjelloun, A., el Harrak, M., Calistri, P., Loutfi, C., Kabbaj, H., Conte, A., Ippoliti, C., Danzetta, M. L., & Belkadi, B. (2017). Seroprevalence of West Nile virus in horses in different Moroccan regions. *Veterinary Medicine and Science*, 3(4), 198–207. <https://doi.org/10.1002/VMS3.71>
- Benzarti, E., Linden, A., Desmecht, D., & Garigliany, M. (2019). Mosquito-borne epornitic flaviviruses: an update and review. *Journal of General Virology*, 100(2), 119–132. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001203>
- Bergmann, F., Trachsel, D. S., Stoeckle, S. D., Sierra, J. B., Lübke, S., Groschup, M. H., Gehlen, H., & Ziegler, U. (2022). Seroepidemiological Survey of West Nile virus infections in horses from Berlin/Brandenburg and North Rhine-Westphalia, Germany. *Viruses*, 14(2), 243. <https://doi.org/10.3390/V14020243/S1>
- Bernabeu-Wittel, M., Ruiz-Pérez, M., Dolores Del Toro, M., Aznar, J., Muniain, Á., de Ory, F., Domingo, C., Pachón, J., Del, V., & Sevilla, R. (2007). West Nile virus past infections in the general population of Southern Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 25(9), 561-5 <https://doi.org/10.115713111181>
- Bielefeldt-Ohmann, H., Bosco-Lauth, A., Hartwig, A. E., Uddin, M. J., Barcelon, J., Suen, W. W., Wang, W., Hall, R. A., & Bowen, R. A. (2017). Characterization of non-lethal West Nile Virus (WNV) infection in horses: subclinical pathology and innate immune response. *Microbial Pathogenesis*, 103, 71–79. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2016.12.018>
- Bigham, A. W., Buckingham, K. J., Husain, S., Emond, M. J., & Bofferding, K. M. (2011). Host genetic risk factors for West Nile virus infection and disease progression. *PLoS ONE*, 6(9), 24745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024745>
- Blitvich, B. J., Bowen, R. A., Marlenee, N. L., Hall, R. A., Bunning, M. L., & Beaty, B. J. (2003). Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for detection of West Nile virus antibodies in domestic mammals. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2676. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2676-2679.2003>
- Blitvich, B. J., Marlenee, N. L., Hall, R. A., Calisher, C. H., Bowen, R. A., Roehrig, J. T., Komar, N., Langevin, S. A., & Beaty, B. J. (2003). Epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies to West Nile virus in multiple avian species. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3), 1041. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1041-1047.2003>

- Bogachek, M. v., Protopopova, E. v., Loktev, V. B., Zaitsev, B. N., Favre, M., Sekatskii, S. K., & Dietler, G. (2008). Immunochemical and single molecule force spectroscopy studies of specific interaction between the laminin binding protein and the West Nile virus surface glycoprotein E domain II. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, 21(1), 55–62. <https://doi.org/10.1002/JMR.866>
- Bogachek, M. v., Zaitsev, B. N., Sekatskii, S. K., Protopopova, E. v., Ternovoi, V. A., Ivanova, A. v., Kachko, A. v., Ivanisenko, V. A., Dietler, G., & Loktev, V. B. (2010). Characterization of glycoprotein E C-end of West Nile virus and evaluation of its interaction force with alphaVbeta3 integrin as putative cellular receptor. *Biochemistry. Biokhimiia*, 75(4), 472–480. <https://doi.org/10.1134/S0006297910040115>
- Bondre, V. P., Sapkal, G. N., Yergolkar, P. N., Fulmali, P. v, Sankararaman, V., Ayachit, V. M., Mishra, A. C., Gore, M. M., & Vijay Bondre, C. P. (2009). Genetic characterization of Bagaza virus (BAGV) isolated in India and evidence of anti-BAGV antibodies in sera collected from encephalitis patients. *Journal of General Virology*, 90, 2644–2649. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012336-0>
- Bouzas, I. G., Diakakis, N., Chaintoutis, S. C., Brellou, G. D., Papanastassopoulou, M., Danis, K., Vlemmas, I., Seuberlich, T., & Dovas, C. I. (2016). Emergence of equine West Nile encephalitis in Central Macedonia, Greece, 2010. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(6), e219–e227. <https://doi.org/10.1111/TBED.12334>
- Brault, A. C., Huang, C. Y. H., Langevin, S. A., Kinney, R. M., Bowen, R. A., Ramey, W. N., Panella, N. A., Holmes, E. C., Powers, A. M., & Miller, B. R. (2007). A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nature Genetics*, 39(9), 1162–1166. <https://doi.org/10.1038/NG2097>
- Bravo-Barriga, D., Aguilera-Sepúlveda, P., Guerrero-Carvajal, F., Llorente, F., Reina, D., Pérez-Martín, J. E., Jiménez-Clavero, M. Á., & Frontera, E. (2021a). West Nile and Usutu virus infections in wild birds admitted to rehabilitation centres in Extremadura, western Spain, 2017–2019. *Veterinary Microbiology*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109020>
- Bravo-Barriga, D., Almeida, A. P. G. de, Delacour-Estrella, S., Peña, R. E., Lucientes, J., Sánchez-Murillo, J. M., & Frontera, E. (2021b). Mosquito fauna in Extremadura (western Spain): Updated catalog with new records, distribution maps, and medical relevance. *Journal of Vector Ecology* 46(1), 70–82. <https://doi.org/10.52707/1081-1710-46.1.70>
- Bravo-Barriga, D., Gouveia Almeida, A. P., Parreira, R., Jiménez-Vidal, D., Pérez-Martín, J. E., Martín-Cuervo, M., & Frontera, E. (2019). First detections of *Aedes albopictus* (tiger mosquito) in the region of Extremadura, west of Spain. In *Gaceta Sanitaria*

- (Vol. 33, Issue 3, pp. 299–300). Ediciones Doyma, S.L.
<https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2018.11.003>
- Bravo-Barriga, D., Parreira, R., Almeida, A. P. G., Calado, M., Blanco-Ciudad, J., Serrano-Aguilera, F. J., Pérez-Martín, J. E., Sánchez-Peinado, J., Pinto, J., Reina, D., & Frontera, E. (2016). *Culex pipiens* as a potential vector for transmission of *Dirofilaria immitis* and other unclassified Filarioidea in Southwest Spain. *Veterinary Parasitology*, 223, 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.04.030>
- Browne, S. M., & Bennett, G. F. (1981). Response of mosquitoes to visual stimuli. *Journal of Medical Entomology*, 18(6), 505–521.
- Brugman, V. A., Hernández-Triana, L. M., Medlock, J. M., Fooks, A. R., Carpenter, S., & Johnson, N. (2018). The role of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) in virus transmission in Europe. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 15, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph15020389>
- Buchebner, N., Zenker, W., Wenker, C., Steinmetz, H. W., Sós, E., Lussy, H., & Nowotny, N. (2013). Low Usutu virus seroprevalence in four zoological gardens in central Europe. *BMC Veterinary Research*, 9. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-153>
- Bunning, M. L., Bowen, R. A., Bruce Cropp, C., Sullivan, K. G., Davis, B. S., Komar, N., Godsey, M. S., Baker, D., Hettler, D. L., Holmes, D. A., Biggerstaff, B. J., & Mitchell, C. J. (2002). Experimental Infection of Horses with West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*, 8(4), 380. <https://doi.org/10.3201/EID0804.010239>
- Burkhalter, K. L., Lindsay, R., Anderson, R., Dibernardo, A., Fong, W., & Nasci, R. S. (2006). Evaluation of commercial assays for detecting West Nile virus antigen. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(1), 64–69. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2006\)22\[64:EOCAFD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2006)22[64:EOCAFD]2.0.CO;2)
- Busquets, N., Alba, A., Allepuz, A., Aranda, C., & Núñez, J. I. (2008). Usutu virus sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 14(5), 861–863. <https://doi.org/10.3201/EID1405.071577>
- Busquets, N., Laranjo-González, M., Soler, M., Nicolás, O., Rivas, R., Talavera, S., Villalba, R., San Miguel, E., Torner, N., Aranda, C., & Napp, S. (2019). Detection of West Nile virus lineage 2 in North-Eastern Spain (Catalonia). *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(2), 617–621. <https://doi.org/10.1111/TBED.13086>
- Caballero-Gómez, J., Cano-Terriza, D., Lecollinet, S., Carbonell, M. D., Martínez-Valverde, R., Martínez-Nevado, E., García-Párraga, D., Lowenski, S., & García-Bocanegra, I. (2020). Evidence of exposure to zoonotic flaviviruses in zoo mammals in Spain and their potential role as sentinel species. *Veterinary Microbiology*, 247. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2020.108763>

- Cadar, D., Becker, N., de Mendonca Campos, R., Börstler, J., Jöst, H., & Schmidt-Chanasit, J. (2014). Usutu virus in bats, Germany, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 20(10), 1771–1773. <https://doi.org/10.3201/EID2010.140909>
- Cadar, D., Lühken, R., van der Jeugd, H., Garigliany, M., Ziegler, U., Keller, M., Lahoreau, J., Lachmann, L., Becker, N., Kik, M., Oude Munnink, B. B., Bosch, S., Tannich, E., Linden, A., Schmidt, V., Koopmans, M. P., Rijks, J., Desmecht, D., Groschup, M. H., ... Schmidt-Chanasit, J. (2017). Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, Western Europe, 2016. *Eurosurveillance*, 22(4), 1–7. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.4.30452>
- Cahill, M. E., Conley, S., DeWan, A. T., & Montgomery, R. R. (2018). Identification of genetic variants associated with dengue or West Nile virus disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S12879-018-3186-6>
- Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, R. E., Porterfield, J. S., Westaway, E. G., & Brandt, W. E. (1989). Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *The Journal of General Virology*, 70 (Pt 1) (1), 37–43. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-1-37>
- Calzolari, M., Angelini, P., Bolzoni, L., Bonilauri, P., Cagarelli, R., Canziani, S., Cereda, D., Cerioli, M. P., Chiari, M., Galletti, G., Moirano, G., Tamba, M., Torri, D., Trogu, T., Albieri, A., Bellini, R., & Lelli, D. (2020). Enhanced West Nile virus circulation in the Emilia-Romagna and Lombardy regions (northern Italy) in 2018 detected by entomological surveillance. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2020.00243>
- Calzolari, M., Chiapponi, C., Bonilauri, P., Lelli, D., Baioni, L., Barbieri, I., Lavazza, A., Pongolini, S., Dottori, M., & Moreno, A. (2017). Co-circulation of two Usutu virus strains in Northern Italy between 2009 and 2014. *Infection, Genetics and Evolution* 51, 255–262. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2017.03.022>
- Calzolari, M., Gaibani, P., Bellini, R., Defilippo, F., Pierro, A., Albieri, A., Maioli, G., Luppi, A., Rossini, G., Balzani, A., Tamba, M., Galletti, G., Gelati, A., Carrieri, M., Poglayen, G., Cavrini, F., Natalini, S., Dottori, M., Sambri, V., ... Bonilauri, P. (2012). Mosquito, bird and human surveillance of West Nile and Usutu viruses in Emilia-Romagna region (Italy) in 2010. *PLoS ONE*, 7(5), e38058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038058>
- Camacho, M. C., Hernández, J. M., Lima-Barbero, J. F., & Höfle, U. (2016). Use of wildlife rehabilitation centres in pathogen surveillance: A case study in white storks (*Ciconia ciconia*). *Preventive Veterinary Medicine*, 130, 106–111. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2016.06.012>

- Camp, J. v., Kolodziejek, J., & Nowotny, N. (2019). Targeted surveillance reveals native and invasive mosquito species infected with Usutu virus. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/S13071-019-3316-Z/TABLES/2>
- Campbell, G. L., Marfin, A. A., Lanciotti, R. S., & Gubler, D. J. (2002). West Nile virus. *Lancet Infectious Diseases*, 2(9), 519–529. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00368-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00368-7)
- Cantile, C., del Piero, F., di Guardo, G., & Arispici, M. (2001). Pathologic and immunohistochemical findings in naturally occurring West Nile virus infection in horses. *Veterinary Pathology*, 38(4), 414–421. <https://doi.org/10.1354/VP.38-4-414>
- Cantile, C., di Guardo, G., Eleni, C., & Arispici, M. (2000a). Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Veterinary Journal*, 32(1), 31–35. <https://doi.org/10.2746/042516400777612080>
- Cantile, C., di Guardo, G., Eleni, C., & Arispici, M. (2000b). Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Veterinary Journal*, 32(1), 31–35. <https://doi.org/10.2746/042516400777612080>
- Cardinale, E., Bernard, C., Lecollinet, S., Rakotoharinome, V. M., Ravaomanana, J., Roger, M., Olive, M. M., Meenowa, D., Jaumally, M. R., Melanie, J., Héraud, J. M., Zientara, S., & Cêtre-Sossah, C. (2017). West Nile virus infection in horses, Indian ocean. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 53, 45–49. <https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2017.06.006>
- Carletti, F., Colavita, F., Rovida, F., Percivalle, E., Baldanti, F., Ricci, I., de Liberato, C., Rosone, F., Messina, F., Lalle, E., Bordi, L., Vairo, F., Capobianchi, M. R., Ippolito, G., Capiello, G., Spanò, A., Meschi, S., & Castilletti, C. (2019). Expanding Usutu virus circulation in Italy: detection in the Lazio region, central Italy, 2017 to 2018. *EuroSurveillance*: 24(3). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.3.1800649>
- Casades-Martí, L., Holgado-Martín, R., Aguilera-Sepúlveda, P., Llorente, F., Pérez-Ramírez, E., Jiménez-Clavero, M. Á., & Ruiz-Fons, F. (2023). Risk factors for exposure of wild birds to West Nile virus in a gradient of wildlife-livestock interaction. *Pathogens* 2023, Vol. 12, Page 83, 12(1), 83. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS12010083>
- Castillo-Olivares, J., Mansfield, K. L., Phipps, L. P., Johnson, N., Tearle, J., & Fooks, A. R. (2011). Antibody response in horses following experimental infection with West Nile Virus lineages 1 and 2. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(3), 206–212. <https://doi.org/10.1111/J.1865-1682.2010.01197.X>
- Castillo-Olivares, J., & Wood, J. (2004). West Nile virus infection of horses. *Veterinary Research*, 35(4), 467–483. <https://doi.org/10.1051/VETRES:2004022>

- Cavalleri, J. v., Korbacska-Kutasi, O., Leblond, A., Paillot, R., Pusterla, N., Steinmann, E., & Tomlinson, J. (2022). European College of Equine Internal Medicine consensus statement on equine flaviviridae infections in Europe. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 36(6). <https://doi.org/10.1111/JVIM.16581>
- CDC. (2021). Final Cumulative Maps and Data | West Nile Virus / CDC. <https://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/cumMapsData.html#one>
- CDC. (2023). Preliminary Maps & Data for 2022 | West Nile Virus / CDC. <https://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/preliminarymapsdata2022/index.html>
- Chabierski, S., Barzon, L., Papa, A., Niedrig, M., Bramson, J. L., Richner, J. M., Palù, G., Diamond, M. S., & Ulbert, S. (2014). Distinguishing West Nile virus infection using a recombinant envelope protein with mutations in the conserved fusion-loop. *BMC Infectious Diseases*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-246>
- Chaintoutis, S. C., Papa, A., Pervanidou, D., & Dovas, C. I. (2019). Evolutionary dynamics of lineage 2 West Nile virus in Europe, 2004–2018: Phylogeny, selection pressure and phylogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 141(May), 106617. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106617>
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., & Rice, C. M. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Review of Microbiology*, 44, 649–688. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MI.44.100190.003245>
- Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E., & Rios, M. (2015). The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/376230>
- Chaskopoulou, A., Dovas, C., Chaintoutis, S., Bouzalas, I., Ara, G., & Papanastassopoulou, M. (2011). Evidence of enzootic circulation of West Nile virus (Nea Santa-Greece-2010, lineage 2), Greece, May to July 2011. *EuroSurveillance*: 16(31). <https://doi.org/10.2807/ese.16.31.19933-en>
- Cheng, Y., Tjaden, N. B., Jaeschke, A., Lühken, R., Ziegler, U., Thomas, S. M., & Beierkuhnlein, C. (2018). Evaluating the risk for Usutu virus circulation in Europe: Comparison of environmental niche models and epidemiological models. *International Journal of Health Geographics*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12942-018-0155-7>
- Chevalier, V., Reynaud, P., Lefrançois, T., Durand, B., Baillon, F., Balança, G., Gaidet, N., Mondet, B., & Lancelot, R. (2009). Predicting West Nile virus seroprevalence in wild birds in Senegal. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 9(6), 589–596. <https://doi.org/10.1089/VBZ.2008.0130>

- Christova, I., Papa, A., Trifonova, I., Panayotova, E., Pappa, S., & Mikov, O. (2020). West Nile virus lineage 2 in humans and mosquitoes in Bulgaria, 2018–2019. *Journal of Clinical Virology*, 127. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104365>
- Chu, J. J. H., & Ng, M. L. (2004). Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *Journal of Virology*, 78(19), 10543–10555. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10543-10555.2004>
- Clé, M., Beck, C., Salinas, S., Lecollinet, S., Gutierrez, S., van de Perre, P., Baldet, T., Foulongne, V., & Simonin, Y. (2019). Usutu virus: A new threat? *Epidemiology and Infection*, 147, 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0950268819001213>
- Cleton, N. B., Godeke, G. J., Reimerink, J., Beersma, M. F., Doorn, H. R. van, Franco, L., Goeijenbier, M., Jimenez-Clavero, M. A., Johnson, B. W., Niedrig, M., Papa, A., Sambri, V., Tami, A., Velasco-Salas, Z. I., Koopmans, M. P. G., & Reusken, C. B. E. M. (2015). Spot the difference-development of a syndrome based protein microarray for specific serological detection of multiple flavivirus infections in travelers. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0003580>
- Cleton, N. B., van Maanen, K., Bergervoet, S. A., Bon, N., Beck, C., Godeke, G. J., Lecollinet, S., Bowen, R., Lelli, D., Nowotny, N., Koopmans, M. P. G., & Reusken, C. B. E. M. (2017). A Serological Protein Microarray for Detection of Multiple Cross-Reactive Flavivirus Infections in Horses for Veterinary and Public Health Surveillance. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(6), 1801–1812. <https://doi.org/10.1111/TBED.12569>
- Colpitts, T. M., Conway, M. J., Montgomery, R. R., & Fikrig, E. (2012). West Nile Virus: biology, transmission, and human infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 635–648. <https://doi.org/10.1128/CMR.00045-12>
- Constant, O., Gil, P., Barthelemy, J., Bolloré, K., Foulongne, V., Desmetz, C., Leblond, A., Desjardins, I., Pradier, S., Joulié, A., Sandoz, A., Amaral, R., Boisseau, M., Rakotoarivony, I., Baldet, T., Marie, A., Frances, B., Salze, F. R., Tinto, B., ... Simonin, Y. (2022). One Health surveillance of West Nile and Usutu viruses: a repeated cross-sectional study exploring seroprevalence and endemicity in Southern France, 2016 to 2020. *EuroSurveillance*: 27(25). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.25.2200068>
- Conway, M. J., Colpitts, T. M., & Fikrig, E. (2014). Role of the Vector in Arbovirus Transmission. *Annual Review of Virology*, 1(1), 71–88. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-031413-085513>

- Cook, C. L., Huang, Y. J. S., Lyons, A. C., Alto, B. W., Unlu, I., Higgs, S., & Vanlandingham, D. L. (2018). North American *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* are competent vectors for Usutu virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0006732>
- Crosbie, S. P., Koenig, W. D., Reisen, W. K., Kramer, V. L., Marcus, L., Carney, R., Pandolfino, E., Bolen, G. M., Crosbie, L. R., Bell, D. A., & Ernest, H. B. (2008). Early impact of West Nile virus on the Yellow-billed Magpie (*Pica Nuttalli*). *The Auk*, 125(3), 542–550. <https://doi.org/10.1525/auk.2008.07040>
- Csank, T., Drzewnioková, P., Korytár, L., Major, P., Gyuranecz, M., Pistl, J., & Bakonyi, T. (2018). A serosurvey of flavivirus infection in horses and birds in Slovakia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 18(4), 206–213. <https://doi.org/10.1089/VBZ.2017.2216>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 2012 9:8, 9(8), 772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Dauphin, G., & Zientara, S. (2007). West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine*, 25(30), 5563–5576. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2006.12.005>
- Davis, B. S., Chang, G.-J. J., Cropp, B., Roehrig, J. T., Martin, D. A., Mitchell, C. J., Bowen, R., & Bunning, M. L. (2001). West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Virology*, 75(9), 4040–4047. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.9.4040-4047.2001>
- de Filette, M., Ulbert, S., Diamond, M. S., & Sanders, N. N. (2012). Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Veterinary Research*, 43(1). <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-16>
- de Heus, P., Kolodziejek, J., Camp, J. v., Dimmel, K., Bagó, Z., Hubálek, Z., van den Hoven, R., Cavalleri, J. M. V., & Nowotny, N. (2019). Emergence of West Nile virus lineage 2 in Europe: Characteristics of the first seven cases of West Nile neuroinvasive disease in horses in Austria. *Transboundary and Emerging Diseases*, December, 1–9. <https://doi.org/10.1111/tbed.13452>
- de Lope, F., Guerrero, J., de la Cruz, C., & da Silva, E. (1985). Quelques aspects de la biologie du Bengali rouge (*Amandava amandava* (L.)) dans le bassin du Guadiana (Extrémadoure, Espagne). *Alauda (Dijon)*, 53(3), 167–180.

- de Wispelaere, M., Desprès, P., & Choumet, V. (2017). European *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* are competent vectors for Japanese Encephalitis virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0005294>
- Decarlo, C. H., Clark, A. B., McGowan, K. J., Ziegler, P. E., Glaser, A. L., Szonyi, B., & Mohammed, H. O. (2011). Factors associated with the risk of West Nile virus among crows in New York State. *Zoonoses and Public Health*, 58(4), 270–275. <https://doi.org/10.1111/J.1863-2378.2010.01346.X>
- Degener, C. M., Geier, M., Kline, D., Urban, J., Willis, S., Ramirez, K., Cloherty, E. R., & Gordon, S. W. (2019). Field trials to evaluate the effectiveness of the biogents®-sweetscent lure in combination with several commercial mosquito traps and to assess the effectiveness of the biogents-mosquitaire trap with and without carbon dioxide. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 35(1), 32–39. <https://doi.org/10.2987/18-6790.1>
- del Amo, J., Sotelo, E., Fernández-Pinero, J., Gallardo, C., Llorente, F., Agüero, M., & Jiménez-Clavero, M. A. (2013). A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus. *Journal of Virological Methods*, 189(2), 321–327. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2013.02.019>
- del Hoyo, J., & Collar, N. J. (2016). Illustrated check list of the birds of the world. *HBW and BirdLife International*. Barcelona, Spain and Cambridge, UK: Lynx Editions in association with BirdLife International; Available: <https://www.lynexds.com/product/hbw-and-birdlife-ilustrated-checklist-birds-world>
- di Gennaro, A., Lorusso, A., Casaccia, C., Conte, A., Monaco, F., & Savini, G. (2014). Serum neutralization assay can efficiently replace plaque reduction neutralization test for detection and quantitation of West Nile virus antibodies in human and animal serum samples. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(10), 1460–1462. <https://doi.org/10.1128/CVI.00426-14>
- Diallo, M., Nabeth, P., Ba, K., Sall, A. A., Ba, Y., Mondo, M., Girault, L., Abdalahi, M. O., & Mathiot, C. (2005). Mosquito vectors of the 1998-1999 outbreak of Rift Valley Fever and other arboviruses (Bagaza, Sanar, Wesselsbron and West Nile) in Mauritania and Senegal. *Medical and Veterinary Entomology*, 19(2), 119–126. <https://doi.org/10.1111/J.0269-283X.2005.00564.X>
- Diamond, M. S. (2009). Progress on the development of therapeutics against West Nile virus. *Antiviral Research*, 83(3), 214. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2009.05.006>

- Digoutte. (1978). Bagaza (BAG) strain Dark Ar B 209. *American Journal of Tropical Medicine Hyg*, 27, 376–377.
- Durand, B., Chevalier, V., Pouillot, R., Labie, J., Marendat, I., Murgue, B., Zeller, H., & Zientara, S. (2002). West Nile virus outbreak in horses, Southern France, 2000: Results of a serosurvey. *Emerging Infectious Diseases*, 8(8), 777–782. <https://doi.org/10.3201/eid0808.010486>
- Durand, B., Haskouri, H., Lowenski, S., Vachieri, N., Beck, C., & Lecollinet, S. (2016). Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: dog as an alternative WNV sentinel species? *Epidemiology and Infection*, 144(9), 1857–1864. <https://doi.org/10.1017/S095026881600011X>
- Ebel, G. D., Dupuis, A. P., Nicholas, D., Young, D., Maffei, J., & Kramer, L. D. (2002). Detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to West Nile virus in birds. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 979–982. <https://doi.org/10.3201/EID0809.020152>
- Egizi, A. M., Farajollahi, A., & Fonseca, D. M. (2014). Diverse host feeding on nesting birds may limit early-season West Nile virus amplification. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 14(6), 447. <https://doi.org/10.1089/VBZ.2013.1536>
- Eiden, M., Gil, P., Ziegler, U., Rakotoarivony, I., Marie, A., Frances, B., L'Ambert, G., Simonin, Y., Foulongne, V., Groschup, M. H., Gutierrez, S., & Eloit, M. (2018). Emergence of two Usutu virus lineages in *Culex pipiens* mosquitoes in the Camargue, France, 2015. *Infection, Genetics and Evolution*, 61, 151–154. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2018.03.020>
- Elizalde, M., Cano-Gómez, C., Llorente, F., Pérez-Ramírez, E., Casades-Martí, L., Aguilera-Sepúlveda, P., Ruiz-Fons, F., Jiménez-Clavero, M. Á., & Fernández-Pinero, J. (2020). A Duplex Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR for Simultaneous Detection and Differentiation of Flaviviruses of the Japanese Encephalitis and Ntaya Serocomplexes in Birds. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(April). <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00203>
- Encinas Grandes, A. (1982). Taxonomía y biología de los mosquitos del área salmantina (Díptera, Culicidae). *Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca*
- Engel, D., Jöst, H., Wink, M., Börstler, J., Bosch, S., Garigliany, M. M., Jöst, A., Czajka, C., Lühken, R., Ziegler, U., Groschup, M. H., Pfeffer, M., Becker, N., Cadar, D., & Schmidt-Chanasit, J. (2016). Reconstruction of the evolutionary history and dispersal of Usutu virus, a neglected emerging arbovirus in Europe and Africa. *MBio*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/MBIO.01938-15>

- Engler, O., Savini, G., Papa, A., Figuerola, J., Groschup, M. H., Kampen, H., Medlock, J., Vaux, A., Wilson, A. J., Werner, D., Jöst, H., Goffredo, M., Capelli, G., Federici, V., Tonolla, M., Patocchi, N., Flacio, E., Portmann, J., Rossi-Pedruzzi, A., ... Johnson, N. (2013). European surveillance for West Nile virus in mosquito populations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(10), 4869–4895. <https://doi.org/10.3390/IJERPH10104869>
- Epidemiosurveillance Santé Animale (ESA). (2018). *Bilan-de-la-circula-tion-du-virus-usutu-en-france*. https://www.platorme-esa.fr/sites/default/files/2021-11/USUTU%20bilan%20270818_v4.pdf
- Epp, T., Waldner, C., West, K., & Townsend, H. (2007). Factors associated with West Nile virus disease fatalities in horses. *The Canadian Veterinary Journal*, 48(11), 1137.
- Erdélyi, K., Ursu, K., Ferenczi, E., Szeredi, L., Rátz, F., Skáre, J., & Bakonyi, T. (2007). Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 7(2), 181–188. <https://doi.org/10.1089/VBZ.2006.0586>
- Eritija, R., Aranda, C., Padrós, J., Goula, M., Lucientes, J., Esosa, R., Marquès, E., & Cáceres, F. (2000). An annotated checklist and bibliography of the mosquitoes of Spain (Diptera: Culicidae). *European Mosquito Bulletin*, 8, 10–18.
- Escribano-Romero, E., Lupulović, D., Merino-Ramos, T., Blázquez, A. B., Lazić, G., Lazić, S., Saiz, J. C., & Petrović, T. (2015). West Nile virus serosurveillance in pigs, wild boars, and roe deer in Serbia. *Veterinary Microbiology*, 176(3–4), 365–369. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2015.02.005>
- Esteves, A., Almeida, A. P. G., Galão, R. P., Parreira, R., Piedade, J., Rodrigues, J. C., Sousa, C. A., & Novo, M. T. (2005). West Nile virus in Southern Portugal, 2004. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 5(4), 410–413. <https://doi.org/10.1089/VBZ.2005.5.410>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2015). West Nile fever - Annual Epidemiological Report for 2015. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-fever-annual-epidemiological-report-2015>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2018). Weekly updates: 2018 West Nile fever transmission season. December 2018–2019. <https://ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/disease-data-ecdc>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2022a). Historical data by year - West Nile virus seasonal surveillance. <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/historical>

- European Centre for Disease Prevention and Control. (2022b). Weekly updates: 2022 West Nile virus transmission season. <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/disease-data-ecdc>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2018). Epidemiological update: West Nile virus transmission season in Europe, 2018. <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-west-nile-virus-transmission-season-europe-2018>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2020). Communicable disease threats report, 31 May -6 June 2020, week 23. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/communicable-disease-threats-report-31-may-6-june-2020-week-23>
- European Centre for Disease Prevention and Control, & European Food Safety Authority. (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 20(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
- European Commission. (2022). *Farm to Fork: New rules to reduce the risk and use of pesticides in the EU*. https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/qanda_22_3694
- European Commission. (2012). Commission implementing decision of 8 August 2012 amending Decision 2002/253/EC laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, 27. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:262:0001:0057:EN:PDF>
- Falgout, B., & Markoff, L. (1995). Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*, 69(11), 7232. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.11.7232-7243.1995>
- Fall, G., di Paola, N., Faye, M., Dia, M., Freire, C. C. de M., Loucoubar, C., Zanotto, P. M. de A., Faye, O., & Sall, A. A. (2017). Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(11), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006078>
- Farfán-Ale, J. A., Blitvich, B. J., Loroño-Pino, M. A., Marlenee, N. L., Rosado-Paredes, E. P., García-Rejón, J. E., Flores-Flores, L. F., Chulim-Perera, L., López-Urbe, M., Pérez-Mendoza, G., Sánchez-Herrera, I., Santamaría, W., Moo-Huchim, J., Gubler, D. J., Cropp, B. C., Calisher, C. H., & Beaty, B. J. (2004). Longitudinal studies of West Nile virus infection in avians, Yucatán State, México. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 4(1), 3–14. <https://doi.org/10.1089/153036604773082942>

- Fernández-Pinero, J., Davidson, I., Elizalde, M., Perk, S., Khinich, Y., & Jiménez-Clavero, M. A. (2014). Bagaza virus and Israel turkey meningoencephalomyelitis virus are a single virus species. *The Journal of General Virology*, 95(4), 883–887. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.061465-0>
- Ferraguti, M., la Puente, J. M. de, Soriguer, R., Llorente, F., Jiménez-Clavero, M. A., & Figuerola, J. (2016). West Nile virus-neutralizing antibodies in wild birds from southern Spain. *Epidemiology and Infection*, 144(9), 1907–1911. <https://doi.org/10.1017/S0950268816000133>
- Figuerola, J., Jiménez-Clavero, M. A., López, G., Rubio, C., Soriguer, R., Gómez-Tejedor, C., & Tenorio, A. (2008). Size matters: West Nile Virus neutralizing antibodies in resident and migratory birds in Spain. *Veterinary Microbiology*, 132(1–2), 39–46. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2008.04.023>
- Figuerola, J., Soriguer, R., Rojo, G., Tejedor, C. G., & Jimenez-Clavero, M. A. (2007). Seroconversion in Wild Birds and Local Circulation of West Nile Virus, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 13(12), 1915. <https://doi.org/10.3201/EID1312.070343>
- Folgado-Fernández, A., Manuel Hernández-Mogollón, J., Alexandre, P., & Duarte, O. (2014). El perfil del turista de eventos culturales: un análisis exploratorio. *Cultura, Desarrollo y Nuevas Tecnologías: VII Jornadas de Investigación En Turismo, Sevilla*, 75–103. <https://idus.us.es/handle/11441/53047>
- Folly, A. J., Lawson, B., Lean, F. Z. X., McCracken, F., Spiro, S., John, S. K., Heaver, J. P., Seilern-Moy, K., Masters, N., Hernandez-Triana, L. M., Phipps, L. P., Nunez, A., Fooks, A. R., Cunningham, A. A., Johnson, N., & McElhinney, L. M. (2020). Detection of Usutu virus infection in wild birds in the United Kingdom, 2020. *Eurosurveillance*, 25(41), 2001732. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.41.2001732/CITE/PLAINTEXT>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299.
- Fox, J. L., Hazell, S. L., Tobler, L. H., & Busch, M. P. (2006). Immunoglobulin G Avidity in Differentiation between Early and Late Antibody Responses to West Nile Virus. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(1), 33. <https://doi.org/10.1128/CVI.13.1.33-36.2006>

- Frazier, C. L., & Shope, R. E. (1979). Detection of antibodies to alphaviruses by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 10(4), 583–585. <https://doi.org/10.1128/JCM.10.4.583-585.1979>
- Fros, J. J., Miesen, P., Vogels, C. B., Gaibani, P., Sambri, V., Martina, B. E., Koenraadt, C. J., van Rij, R. P., Vlak, J. M., Takken, W., & Pijlman, G. P. (2015). Comparative Usutu and West Nile virus transmission potential by local *Culex pipiens* mosquitoes in north-western Europe. *One Health (Amsterdam, Netherlands)*, 1, 31–36. <https://doi.org/10.1016/J.ONEHLT.2015.08.002>
- Fynmore, N., Lühken, R., Maisch, H., Risch, T., Merz, S., Kliemke, K., Ziegler, U., Schmidt-Chanasit, J., & Becker, N. (2021). Rapid assessment of West Nile virus circulation in a German zoo based on honey-baited FTA cards in combination with box gravid traps. *Parasites and Vectors*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S13071-021-04951-8/FIGURES/4>
- Gaibani, P., Cavrini, F., Gould, E. A., Rossini, G., Pierro, A., Landini, M. P., & Sambri, V. (2013). Comparative genomic and phylogenetic analysis of the first Usutu virus isolate from a human patient presenting with neurological symptoms. *PloS One*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0064761>
- Gaibani, P., & Rossini, G. (2017). An overview of Usutu virus. *Microbes and Infection*, 19(7–8), 382–387. <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2017.05.003>
- Gamino, V., & Höfle, U. (2013). Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review. *Veterinary Research* 44(1):39 <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-39>
- Gangoso, L., Aragonés, D., Martínez-de la Puente, J., Lucientes, J., Delacour-Estrella, S., Estrada Peña, R., Montalvo, T., Bueno-Marí, R., Bravo-Barriga, D., Frontera, E., Marqués, E., Ruiz-Arrondo, I., Muñoz, A., Oteo, J. A., Miranda, M. A., Barceló, C., Arias Vázquez, M. S., Silva-Torres, M. I., Ferraguti, M. & Figuerola, J. (2020). Determinants of the current and future distribution of the West Nile virus mosquito vector *Culex pipiens* in Spain. *Environmental Research*, 188, 109837. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2020.109837>
- García San Miguel Rodríguez-Alarcón, L., JSierra Moros, M.J., Pérez Formigó, J., Suárez Rodríguez, B. & Simón Soria, F. (2020). Meningoencefalitis por el virus del Nilo occidental en España (2ª actualización-cierre de temporada). https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/docs/20200925_ERR_Nilo_Occidental.pdf
- García-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Napp, S., Jaén-Téllez, J. A., Fernández-Morente, M., Fernández-Molera, V., & Arenas, A. (2012). Seroprevalence and risk factors

- associated to West Nile virus in horses from Andalusia, Southern Spain. *Veterinary Microbiology*, 160(3–4), 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.06.027>
- García-Bocanegra, I., Belkhiria, J., Napp, S., Cano-Terriza, D., Jiménez-Ruiz, S., & Martínez-López, B. (2018). Epidemiology and spatio-temporal analysis of West Nile virus in horses in Spain between 2010 and 2016. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(2), 567–577. <https://doi.org/10.1111/tbed.12742>
- García-Bocanegra, I., Busquets, N., Napp, S., Alba, A., Zorrilla, I., Villalba, R., & Arenas, A. (2011a). Serosurvey of West Nile virus and other flaviviruses of the Japanese encephalitis antigenic complex in birds from Andalusia, southern Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(8), 1107–1113. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0237>
- García-Bocanegra, I., Jaén-Téllez, J. A., Napp, S., Arenas-Montes, A., Fernández-Morente, M., Fernández-Molera, V., & Arenas, A. (2011b). West Nile Fever outbreak in horses and humans, Spain, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12), 2397. <https://doi.org/10.3201/EID1712.110651>
- García-Bocanegra, I., Jaén-Téllez, J. A., Napp, S., Arenas-Montes, A., Fernández-Morente, M., Fernández-Molera, V., & Arenas, A. (2012). Monitoring of the West Nile virus epidemic in Spain between 2010 and 2011. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(5), 448–455. <https://doi.org/10.1111/J.1865-1682.2011.01298.X>
- García-Bocanegra, I., Jurado-Tarifa, E., Cano-Terriza, D., Martínez, R., Pérez-Marín, J. E., & Lecollinet, S. (2018). Exposure to West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in dogs in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(3), 765–772. <https://doi.org/10.1111/TBED.12801>
- García-Bocanegra, I., Paniagua, J., Gutiérrez-Guzmán, A. v., Lecollinet, S., Boadella, M., Arenas-Montes, A., Cano-Terriza, D., Lowenski, S., Gortázar, C., & Höfle, U. (2016). Spatio-temporal trends and risk factors affecting West Nile virus and related flavivirus exposure in Spanish wild ruminants. *BMC Veterinary Research*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S12917-016-0876-4>
- García-Bocanegra, I., Zorrilla, I., Rodríguez, E., Rayas, E., Camacho, L., Redondo, I., & Gómez-Guillamón, F. (2013). Monitoring of the Bagaza virus epidemic in wild bird species in Spain, 2010. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60(2), 120–126. <https://doi.org/10.1111/J.1865-1682.2012.01324.X>
- García-Carrasco, J.-M., Muñoz, A.-R., Olivero, J., Segura, M., & Real, R. (2021). *Predicting the spatio-temporal spread of West Nile virus in Europe*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009022>

- Garrido Bautista, J. (2020). *Alcaudón común*- *Lanius senator*. Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. <http://www.vertebradosibericos.org/>
- Gibb, R., Redding, D. W., Chin, K. Q., Donnelly, C. A., Blackburn, T. M., Newbold, T., & Jones, K. E. (2020). Zoonotic host diversity increases in human-dominated ecosystems. *Nature* 2020 584:7821, 584(7821), 398–402. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2562-8>
- Gibbs, S. E. J., Hoffman, D. M., Stark, L. M., Marlenee, N. L., Blitvich, B. J., Beaty, B. J., & Stallknecht, D. E. (2005). Persistence of antibodies to West Nile virus in naturally infected Rock Pigeons (*Columba livia*). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(5), 665. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.5.665-667.2005>
- Giesen, C., Herrador, Z., Fernandez-Martinez, B., Figuerola, J., Gangoso, L., Vazquez, A., & Gómez-Barroso, D. (2023). A systematic review of environmental factors related to WNV circulation in European and Mediterranean countries. *One Health*, 16, 100478. <https://doi.org/10.1016/J.ONEHLT.2022.100478>
- Giglia, G., Agliani, G., Oude Munnink, B. B., Sikkema, R., Mandara, M. T., Lepri, E., Kik, M., Ijzer, J., Rijks, J. M., Fast, C., Koopmans, M. P. G., Verheije, M. H., Gröne, A., Reusken, C. B. E. M., & van den Brand, J. M. A. (2021). Pathology and pathogenesis of Eurasian blackbirds (*Turdus merula*) naturally infected with Usutu virus. *Viruses*, 13(8), 1481. <https://doi.org/10.3390/V13081481/S1>
- Gilioli, G., & Mariani, L. (2011). Sensitivity of *Anopheles gambiae* population dynamics to meteo-hydrological variability: a mechanistic approach. *Malaria Journal*, 10. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-294>
- Goldblum, N., Sterk, V. v, & Jasinskaklingberg, W. (1957). The natural history of West Nile fever. II. Virological findings and the development of homologous and heterologous antibodies in West Nile infection in man. *American Journal of Hygiene*, 66(3), 363–380.
- Gollins, S. W., & Porterfield, J. S. (1986). pH-dependent fusion between the flavivirus West Nile and liposomal model membranes. *The Journal of General Virology*, 67 (1), 157–166. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-1-157>
- Gomes, B., Sousa, C. A., Vicente, J. L., Pinho, L., Calderón, I., Arez, E., Almeida, A. P., Donnelly, M. J., & Pinto, J. (2013). Feeding patterns of *molestus* and *pipiens* forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in a region of high hybridization. *Parasites and Vectors*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-93/TABLES/3>
- Gould, E., & Solomon, T. (2008). Pathogenic flaviviruses. *Lancet (London, England)*, 371(9611), 500–509. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60238-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60238-X)

- Gould, L. H., & Fikrig, E. (2004). West Nile virus: a growing concern? *The Journal of Clinical Investigation*, 113(8), 1102–1107. <https://doi.org/10.1172/JCI21623>
- Graninger, M., Hubmer, S., Riederer, F., Kettner, S., Hauk, M., Auf, T., Aberle, J. H., Stiasny, K., Aberle, S. W., & Camp, J. v. (2022). The first case of Usutu virus neuroinvasive disease in Austria, 2021. *Open Forum Infectious Diseases*, 9(7). <https://doi.org/10.1093/OFID/OFAC255>
- Guerrero-Carvajal, F., Bravo-Barriga, D., Martín-Cuervo, M., Aguilera-Sepúlveda, P., Ferraguti, M., Jiménez-Clavero, M. Á., Llorente, F., Alonso, J. M., & Frontera, E. (2021). Serological evidence of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids from western Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(3). <https://doi.org/10.1111/tbed.13810>
- Haba, Y., & McBride, L. (2022). Origin and status of *Culex pipiens* mosquito ecotypes. *Current Biology*, 32(5), R237–R246. <https://doi.org/10.1016/j.CUB.2022.01.062>
- Habarugira, G., Suen, W. W., Hobson-Peters, J., Hall, R. A., & Bielefeldt-Ohmann, H. (2020). West Nile virus: an update on pathobiology, epidemiology, diagnostics, control and “One Health” Implications. *Pathogens*, 9(7), 1–51. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9070589>
- Hassine, T. ben, Massis, F. de, Calistri, P., Savini, G., Mohamed, B. B., Ranen, A., & Gennaro, A. di. (2014). First detection of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids in the South-west of Tunisia. *Transboundary and Emerging Disease* 61(5): 385-9. <https://doi.org/10.1111/tbed.12259>
- Hawkes, F., & Gibson, G. (2016). Seeing is believing: The nocturnal malarial mosquito *Anopheles coluzzii* responds to visual host-cues when odour indicates a host is nearby. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1609-z>
- Heinz, F., Collet, M., Purcell, R., Gould, E., Howeward, C., & Houghton, M. (2000). Family Flaviviridae. In M. van Regenmortel (Ed.), *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses* (pp. 859–878). Academic Press.
- Hernández Mogollón, J. M., Campón Cerro, A. M., & di Clemente, E. (2013). El turista rural en entornos de alta calidad medioambiental. *Journal of Tourism Analysis = Revista de Análisis Turístico*, ISSN 1885-2564, Nº. 16, 2013, Págs. 21-31, 16, 21–31. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4632086&info=resumen&idoma=ENG>
- Hernández-Triana, L. M., de Marco, M. F., Mansfield, K. L., Thorne, L., Lumley, S., Marston, D., Fooks, A. A., & Johnson, N. (2018). Assessment of vector competence

- of UK mosquitoes for Usutu virus of African origin. *Parasites & Vectors*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-018-2959-5>
- Hernández-Triana, L. M., Jeffries, C. L., Mansfield, K. L., Carnell, G., Fooks, A. R., & Johnson, N. (2014). Emergence of West Nile virus lineage 2 in Europe: A review on the introduction and spread of a mosquito-borne disease. *Frontiers in Public Health*, 2(DEC), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00271>
- Herrmann, S., Leshem, B., Landes, S., Rager-Zisman, B., & Marks, R. S. (2005). Chemiluminescent optical fiber immunosensor for the detection of anti-West Nile virus IgG. *Talanta*, 66(1), 6–14. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2004.10.013>
- Higgs, S., Schneider, B. S., Vanlandingham, D. L., Klingler, K. A., & Gould, E. A. (2005). Nonviremic transmission of West Nile virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(25), 8871–8874. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0503835102>
- Hobson-Peters, J. (2012). Approaches for the development of rapid serological assays for surveillance and diagnosis of infections caused by zoonotic flaviviruses of the Japanese encephalitis virus serocomplex. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/379738>
- Höfle, U., Blanco, J. M., Crespo, E., Naranjo, V., Jiménez-Clavero, M. A., Sanchez, A., de la Fuente, J., & Gortazar, C. (2008). West Nile virus in the endangered Spanish imperial eagle. *Veterinary Microbiology*, 129(1–2), 171–178. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2007.11.006>
- Höfle, U., Cardona Cabrera, T., Sánchez-Cano, A., de Fernández de Mera, I. G., Rialde, M. A., Moraga-Fernández, A., & Ortiz, J. A. (2022). Bagaza virus and *Plasmodium* spp. coinfection in Red-legged Partridges (*Alectoris rufa*), in Southern Spain 2019. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(5). <https://doi.org/10.1111/TBED.14658>
- Höfle, U., Gamino, V., Fernández de Mera, I. G., Mangold, A. J., Ortíz, J. A., & de la Fuente, J. (2013). Usutu virus in migratory song thrushes, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 19(7), 1173–1175. <https://doi.org/10.3201/EID1907.130199>
- Hofmeister, E., Porter, R. E., & Christian Franson, J. (2015). Experimental susceptibility of Wood Ducks (*Aix sponsa*) for West Nile virus. *Journal of Wildlife Diseases*, 51(2), 411–418. <https://doi.org/10.7589/2014-08-216>
- Hogrefe, W. R., Moore, R., Lape-Nixon, M., Wagner, M., & Prince, H. E. (2004). Performance of immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme-linked immunosorbent assays using a West Nile virus recombinant antigen (preM/E) for detection of West Nile virus- and other flavivirus-specific antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), 4641–4648. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4641-4648.2004>

- Holmes, D. A., Purdy, D. E., Chao, D. Y., Noga, A. J., & Chang, G. J. J. (2005). Comparative analysis of immunoglobulin M (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay using virus-like particles or virus-infected mouse brain antigens to detect IgM antibody in sera from patients with evident flaviviral infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7), 3227–3236. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3227-3236.2005>
- Hönig, V., Palus, M., Kaspar, T., Zemanova, M., Majerova, K., Hofmannova, L., Papezik, P., Sikutova, S., Rettich, F., Hubalek, Z., Rudolf, I., Votypka, J., Modry, D., & Ruzek, D. (2019). Multiple Lineages of Usutu Virus (Flaviviridae, Flavivirus) in Blackbirds (*Turdus merula*) and Mosquitoes (*Culex pipiens*, *Culex modestus*) in the Czech Republic (2016-2019). *Microorganisms*, 7(11). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7110568>
- Hubálek, Z. (2008). Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitology Research*, 103 Suppl 1, S29-43. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1064-7>
- Hubálek, Z., & Halouzka, J. (1999). West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 5(5), 643–650. <https://doi.org/10.3201/EID0505.990505>
- Hubálek, Z., Rudolf, I., & Nowotny, N. (2014). Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. *Advances in Virus Research*, 89, 201–275. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800172-1.00005-7>
- Hukkanen, R. R., Liggitt, H. D., Kelley, S. T., Grant, R., Anderson, D. M., Hall, R. A., Tesh, R. B., DaRosa, A. P. T., & Bielefeldt-Ohmann, H. (2006). West Nile and St. Louis encephalitis virus antibody seroconversion, prevalence, and persistence in naturally infected pig-tailed macaques (*Macaca nemestrina*). *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(6), 711–714. <https://doi.org/10.1128/CDI.00031-06>
- Hunt, A. R., Hall, R. A., Kerst, A. J., Nasci, R. S., Savage, H. M., Panella, N. A., Gottfried, K. L., Burkhalter, K. L., & Roehrig, J. T. (2002). Detection of West Nile Virus Antigen in Mosquitoes and Avian Tissues by a Monoclonal Antibody-Based Capture Enzyme Immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), 2023. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2023-2030.2002>
- Jiménez-Clavero, M. A., Agüero, M., Rojo, G., & Gómez-Tejedor, C. (2006). A new fluorogenic real-time RT-PCR assay for detection of lineage 1 and lineage 2 West Nile viruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18(5), 459–462. <https://doi.org/10.1177/104063870601800505>
- Jiménez-Clavero, M. A., Llorente, F., Sotelo, E., Soriguer, R., Gómez-Tejedor, C., & Figuerola, J. (2010). West Nile virus serosurveillance in horses in Donana, Spain,

- 2005 to 2008. *The Veterinary Record*, 167(10), 379–380.
<https://doi.org/10.1136/VR.C3155>
- Jiménez-Clavero, M. A., Tejedor, C. G., Rojo, G., Soriguer, R., & Figuerola, J. (2007). Serosurvey of West Nile virus in equids and bovids in Spain. *The Veterinary Record*, 161(6), 212. <https://doi.org/10.1136/VR.161.6.212>
- Johnson, A. J., Langevin, S., Wolff, K. L., & Komar, N. (2003). Detection of anti-West Nile virus immunoglobulin M in chicken serum by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), 2002–2007.
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2002-2007.2003>
- Johnson, A. J., Martin, D. A., Karabatsos, N., & Roehrig, J. T. (2000). Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(5), 1827–1831. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.5.1827-1831.2000>
- Johnson, A. J., Noga, A. J., Kosoy, O., Lanciotti, R. S., Johnson, A. A., & Biggerstaff, B. J. (2005). Duplex microsphere-based immunoassay for detection of anti-West Nile virus and anti-St. Louis encephalitis virus immunoglobulin m antibodies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(5), 566–574.
<https://doi.org/10.1128/CDLI.12.5.566-574.2005>
- Jöst, H., Bialonski, A., Maus, D., Sambri, V., Eiden, M., Groschup, M. H., Günther, S., Becker, N., & Schmidt-Chanasit, J. (2011). Isolation of Usutu virus in Germany. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(3), 551.
<https://doi.org/10.4269/AJTMH.2011.11-0248>
- Joubert, L., Oudar, J., Hannoun, C., Beytout, D., Corniou, B., Guillon, J. C., & Panthier, R. (1970). Epidemiology of the West Nile virus: study of a focus in Camargue. IV. Meningo-encephalomyelitis of the horse. *Annales de l'Institut Pasteur*, 118(2), 239–247.
- Jourdain, E., Toussaint, Y., Leblond, A., Bicout, D. J., Sabatier, P., & Gauthier-Clerc, M. (2007). Bird species potentially involved in introduction, amplification, and spread of West Nile virus in a Mediterranean wetland, the Camargue (Southern France). *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 7(1), 15–33.
<https://doi.org/10.1089/VBZ.2006.0543>
- Jozan, M., Evans, R., McLean, R., Hall, R., Tangredi, B., Reed, L., & Scott, J. (2003). Detection of West Nile Virus infection in birds in the United States by blocking ELISA and immunohistochemistry. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 3(3), 99–110. <https://doi.org/10.1089/153036603768395799>

- Jupp, P. G. (1974). Laboratory studies on the transmission of West Nile virus by *Culex univittatus* Theobald; factors influencing the transmission rate. *Journal of Medical Entomology*, 11(4), 455–458. <https://doi.org/10.1093/JMEDENT/11.4.455>
- Jurado-Tarifa, E., Napp, S., Lecollinet, S., Arenas, A., Beck, C., Cerdà-Cuellar, M., Fernández-Morente, M., & García-Bocanegra, I. (2016a). Monitoring of West Nile virus, Usutu virus and Meaban virus in waterfowl used as decoys and wild raptors in southern Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 49, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.10.001>
- Jurado-Tarifa, E., Napp, S., Lecollinet, S., Arenas, A., Beck, C., Cerdà-Cuellar, M., Fernández-Morente, M., & García-Bocanegra, I. (2016b). Monitoring of West Nile virus, Usutu virus and Meaban virus in waterfowl used as decoys and wild raptors in southern Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 49, 58–64. <https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2016.10.001>
- Kaptoul, D., Viladrich, P. F., Domingo, C., Niubó, J., Martínez-Yélamos, S., de Ory, F., & Tenorio, A. (2007). West Nile virus in Spain: report of the first diagnosed case (in Spain) in a human with aseptic meningitis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 39(1), 70–71. <https://doi.org/10.1080/00365540600740553>
- Karim, S.-U., & Bai, F. (2023). Introduction to West Nile Virus. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2585, 1–7. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2760-0_1
- Kauffman, E. B., Jones, S. A., Dupuis, A. P., Ngo, K. A., Bernard, K. A., & Kramer, L. D. (2003). Virus Detection Protocols for West Nile Virus in vertebrate and mosquito specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(8), 3661. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3661-3667.2003>
- Kemenesi, G., Soltész, Z., Szentpáli-Gavallér, K., Jakab, F., Tóth, M., Antal, L., Bálint, Á., Bakonyi, T., Erdélyi, K., Bányai, K., & Dán, Á. (2014). Monitoring of West Nile virus in Mosquitoes Between 2011–2012 in Hungary. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14(9), 648–655. <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1549>
- Kilpatrick, A. M., Meola, M. A., Moudy, R. M., & Kramer, L. D. (2008). Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* Mosquitoes. *PLOS Pathogens*, 4(6), e1000092. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000092>
- Kim, D., Rusch, T. W., & Lee, D. K. (2021). Response of *Culex pipiens pallens* to visual and olfactory stimuli from a mosquito trap. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 37(2), 76–82. <https://doi.org/10.2987/20-6966.1>
- Klaus, C., Ziegler, U., Kalthoff, D., Hoffmann, B., & Beer, M. (2014). Tick-borne encephalitis virus (TBEV) - findings on cross reactivity and longevity of TBEV

- antibodies in animal sera. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-78/FIGURES/1>
- Klobucar, A., Savic, V., Posavec, M. C., Petrinic, S., Kuhar, U., Toplak, I., Madic, J., & Vilibic-Cavlek, T. (2021). Screening of mosquitoes for West Nile virus and Usutu virus in Croatia, 2015–2020. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/TROPICALMED6020045>
- Konishi, E., & Mason, P. W. (1993). Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *Journal of Virology*, 67(3), 1672–1675. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.3.1672-1675.1993>
- Koraka, P., Zeller, H., Niedrig, M., Osterhaus, A. D. M. E., & Groen, J. (2002). Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA. *Microbes and Infection*, 4(12), 1209–1215. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01647-7](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01647-7)
- Kramer, L. D. (2016). Complexity of virus - vector interactions. *Current Opinion in Virology*, 21, 81. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2016.08.008>
- Kramer, L. D., & Ciota, A. T. (2015). Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Current Opinion in Virology*, 15, 112–118. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2015.10.003>
- Kramer, L. D., Styer, L. M., & Ebel, G. D. (2008). A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annual Review of Entomology*, 53, 61–81. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ENTO.53.103106.093258>
- Kronefeld, M., Dittmann, M., Zielke, D., Werner, D., & Kampen, H. (2012). Molecular confirmation of the occurrence in Germany of *Anopheles daciae* (Diptera, Culicidae). *Parasites & Vectors*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-250>
- Kuno, G., & Chang, G. J. J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of Virology*, 152(4), 687–696. <https://doi.org/10.1007/S00705-006-0903-Z>
- Kurolt, I. C., Krajnović, V., Topić, A., Kuzman, I., Baršić, B., & Markotić, A. (2014). First molecular analysis of West Nile virus during the 2013 outbreak in Croatia. *Virus Research*, 189, 63–66. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2014.04.017>
- Kutasi, O., Bakonyi, T., Lecollinet, S., Biksi, I., Ferenczi, E., Bahuon, C., Sardi, S., Zientara, S., & Szenci, O. (2011). Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile virus in Hungary. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(3), 586–591. <https://doi.org/10.1111/J.1939-1676.2011.0715.X>

- Kyung, M. C., Liszewski, M. K., Nybakken, G., Davis, A. E., Townsend, R. R., Fremont, D. H., Atkinson, J. P., & Diamond, M. S. (2006). West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 19111–19116. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0605668103>
- LaDeau, S. L., Allan, B. F., Leisnham, P. T., & Levy, M. Z. (2015). The ecological foundations of transmission potential and vector-borne disease in urban landscapes. *Functional Ecology*, 29(7), 889–901. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12487>
- Lafri, I., Prat, C. M., Bitam, I., Gravier, P., Besbaci, M., Zeroual, F., Ben-Mahdi, M. H., Davoust, B., & Leparç-Goffart, I. (2017). Seroprevalence of West Nile virus antibodies in equids in the North-East of Algeria and detection of virus circulation in 2014. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 50, 8–12. <https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2016.11.005>
- Lanciotti, R. S., Kerst, A. J., Nasci, R. S., Godsey, M. S., Mitchell, C. J., Savage, H. M., Komar, N., Panella, N. A., Allen, B. C., Volpe, K. E., Davis, B. S., & Roehrig, J. T. (2000). Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), 4066–4071. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.11.4066-4071.2000>
- Laurent-Rolle, M., Boer, E. F., Lubick, K. J., Wolfenbarger, J. B., Carmody, A. B., Rockx, B., Liu, W., Ashour, J., Shupert, W. L., Holbrook, M. R., Barrett, A. D., Mason, P. W., Bloom, M. E., García-Sastre, A., Khromykh, A. A., & Best, S. M. (2010). The NS5 protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferon-mediated JAK-STAT signaling. *Journal of Virology*, 84(7), 3503–3515. <https://doi.org/10.1128/JVI.01161-09>
- Lefrançois, T., Blitvich, B. J., Pradel, J., Molia, S., Vachiéry, N., Pallavicini, G., Marlenee, N. L., Zientara, S., Petitclerc, M., & Martinez, D. (2005). West Nile Virus Surveillance, Guadeloupe, 2003–2004. *Emerging Infectious Diseases*, 11(7), 1100. <https://doi.org/10.3201/EID1107.050105>
- Lehane, M. J. (2005). *The Biology of Blood-Sucking in Insects: Vol. 2nd Edition (Second)*. Cambridge University Press.
- Lelli, D., Moreno, A., Brocchi, E., Sozzi, E., Capucci, L., Canelli, E., Barbieri, I., Zeller, H., & Cordioli, P. (2012). West Nile virus: characterization and diagnostic applications of monoclonal antibodies. *Virology Journal*, 9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-81>

- Leung, J. Y., Pijlman, G. P., Kondratieva, N., Hyde, J., Mackenzie, J. M., & Khromykh, A. A. (2008). Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *Journal of Virology*, 82(10), 4731–4741. <https://doi.org/10.1128/JVI.00002-08>
- Levett, P. N., Sonnenberg, K., Sidaway, F., Shead, S., Niedrig, M., Steinhagen, K., Horsman, G. B., & Drebot, M. A. (2005). Use of Immunoglobulin G avidity assays for differentiation of primary from previous infections with West Nile Virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 5873. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.5873-5875.2005>
- Lim, S. M., Geervliet, M., Verhagen, J. H., Müskens, G. J. D. M., Majoor, F. A., Osterhaus, A. D. M. E., & Martina, B. E. E. (2018). Serologic evidence of West Nile virus and Usutu virus infections in Eurasian coots in the Netherlands. *Zoonoses and Public Health*, 65(1), 96–102. <https://doi.org/10.1111/zph.12375>
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (1997). trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *Journal of Virology*, 71(12), 9608–9617. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.12.9608-9617.1997>
- Lindsey, H. S., Calisher, C. H., & Mathews, J. H. (1976). Serum dilution neutralization test for California group virus identification and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, 4(6), 503–510. <https://doi.org/10.1128/JCM.4.6.503-510.1976>
- Linke, S., Ellerbrok, H., Niedrig, M., Nitsche, A., & Pauli, G. (2007). Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, 146(1–2), 355–358. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2007.05.021>
- Linke, S., MacKay, W. G., Scott, C., Wallace, P., & Niedrig, M. (2011). Second external quality assessment of the molecular diagnostic of West Nile virus: are there improvements towards the detection of WNV? *Journal of Clinical Virology* 52(3), 257–260. <https://doi.org/10.1016/J.JCV.2011.08.010>
- Liu, W. J., Chen, H. B., Wang, X. J., Huang, H., & Khromykh, A. A. (2004). Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *Journal of Virology*, 78(22), 12225–12235. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.22.12225-12235.2004>
- Llopis, I. V., Rossi, L., di Gennaro, A., Mosca, A., Teodori, L., Tomassone, L., Grego, E., Monaco, F., Lorusso, A., & Savini, G. (2015). Further circulation of West Nile and Usutu viruses in wild birds in Italy. *Infection, Genetics and Evolution* 32, 292–297. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2015.03.024>
- Llorente, F., García-Irazábal, A., Pérez-Ramírez, E., Cano-Gómez, C., Sarasa, M., Vázquez, A., & Jiménez-Clavero, M. Á. (2019). Influence of flavivirus co-circulation in

- serological diagnostics and surveillance: A model of study using West Nile, Usutu and Bagaza viruses. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(5), 2100–2106. <https://doi.org/10.1111/TBED.13262>
- Llorente, F., Pérez-Ramírez, E., Fernández-Pinero, J., Elizalde, M., Figuerola, J., Soriguer, R. C., & Jiménez-Clavero, M. Á. (2015). Bagaza virus is pathogenic and transmitted by direct contact in experimentally infected partridges but is not infectious in house sparrows and adult mice. *Veterinary Research*, 46(1). <https://doi.org/10.1186/S13567-015-0233-9>
- Llorente, F., Pérez-Ramírez, E., Fernández-Pinero, J., Soriguer, R., Figuerola, J., & Jiménez-Clavero, M. Á. (2013). Flaviviruses in game birds, southern Spain, 2011–2012. *Emerging Infectious Diseases*, 19(6), 1023–1025. <https://doi.org/10.3201/EID1906.130122>
- Lobigs, M., Müllbacher, A., Wang, Y., Pavy, M., & Lee, E. (2003). Role of type I and type II interferon responses in recovery from infection with an encephalitic flavivirus. *The Journal of General Virology*, 84(Pt 3), 567–572. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.18654-0>
- Long, M. T., Jeter, W., Hernandez, J., Sellon, D. C., Gosche, D., Gillis, K., Bille, E., & Gibbs, E. P. (2006). Diagnostic performance of the equine IgM capture ELISA for serodiagnosis of West Nile virus infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(3), 608–613. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2006\)20](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20)
- López, G., Jiménez-Clavero, M. Á., Tejedor, C. G., Soriguer, R., & Figuerola, J. (2008). Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in Spain is related to the behavior of migratory birds. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 8(5), 615–621. <https://doi.org/10.1089/VBZ.2007.0200>
- López, G., Jiménez-Clavero, M. Á., Vázquez, A., Soriguer, R., Gómez-Tejedor, C., Tenorio, A., & Figuerola, J. (2011). Incidence of West Nile virus in birds arriving in wildlife rehabilitation centers in southern Spain. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 11(3), 285–290. <https://doi.org/10.1089/VBZ.2009.0232>
- López-Ruiz, N., Montaña-Remacha, M. del C., Durán-Pla, E., Pérez-Ruiz, M., Navarro-Marí, J. M., Salamanca-Rivera, C., Miranda, B., Oyonarte-Gómez, S., & Ruiz-Fernández, J. (2018). West Nile virus outbreak in humans and epidemiological surveillance, west Andalusia, Spain, 2016. *Eurosurveillance*, 23(14), 17–00261. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.14.17-00261/CITE/PLAINTEXT>
- Lvov, D. K., Butenko, A. M., Gromashevsky, V. L., Kovtunov, A. I., Prilipov, A. G., Kinney, R., Aristova, V. A., Dzharkenov, A. F., Samokhvalov, E. I., Savage, H. M., Shchelkanov, M. Y., Galkina, I. v., Deryabin, P. G., Gubler, D. J., Kulikova, L. N., Alkhovsky, S. K.,

- Moskvina, T. M., Zlobina, L. v., Sadykova, G. K., ... Voronina, A. G. (2004). West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. *Archives of Virology. Supplementum*, 18, 85–96. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0572-6_7
- Macdonald, J., Tonry, J., Hall, R. A., Williams, B., Palacios, G., Ashok, M. S., Jabado, O., Clark, D., Tesh, R. B., Briese, T., & Lipkin, W. I. (2005). NS1 protein secretion during the acute phase of West Nile virus infection. *Journal of Virology*, 79(22), 13924–13933. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.13924-13933.2005>
- Madewell, Z. J. (2020). Arboviruses and Their Vectors. *Southern Medical Journal*, 113(10), 520. <https://doi.org/10.14423/SMJ.0000000000001152>
- Malan, A. K., Martins, T. B., Hill, MD, H. R., Litwin, MD, C. M., & Stipanovich, P. J. (2003). Detection of IgG and IgM to West Nile virus. Development of an immunofluorescence assay. *American Journal of Clinical Pathology*, 119(4), 508–515. <https://doi.org/10.1309/WJJ7-UE42-DFHT-TF1X>
- Malik, Y. S., Milton, A. A. P., Ghatak, S., & Ghosh, S. (2021). Role of birds in transmitting zoonotic pathogens. *Springer Singapore*. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-4554-9>
- Malkinson, M., Banet, C., Weisman, Y., Pokamunski, S., King, R., Drouet, M. T., & Deubel, V. (2002). Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerging Infectious Diseases*, 8(4), 392–397. <https://doi.org/10.3201/EID0804.010217>
- Mannasse, B., Mendelson, E., Orshan, L., Mor, O., Shalom, U., Yeger, T., & Lustig, Y. (2017). Usutu Virus RNA in Mosquitoes, Israel, 2014-2015. *Emerging Infectious Diseases*, 23(10), 1699–1702. <https://doi.org/10.3201/EID2310.171017>
- MAPA. (2022). Actualización de la situación epidemiológica de la fiebre del Nilo occidental (West Nile Fever). https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/informefno_2022-04-27_tcm30-435293.pdf
- MAPAMA. (2020). Fiebre del Nilo Occidental. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/fiebre-nilo-occidental/F_O_Nilo.aspx
- Marfin, A. A., & Gubler, D. J. (2001). West Nile encephalitis: an emerging disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(10), 1713–1719. <https://doi.org/10.1086/322700>

- Marini, G., Manica, M., Delucchi, L., Pugliese, A., & Rosà, R. (2021). Spring temperature shapes West Nile virus transmission in Europe. *Acta Tropica*, 215. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2020.105796>
- Martin, D. A., Biggerstaff, B. J., Allen, B., Johnson, A. J., Lanciotti, R. S., & Roehrig, J. T. (2002). Use of Immunoglobulin M cross-reactions in differential diagnosis of human flaviviral encephalitis infections in the United States. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(3), 544. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.3.544-549.2002>
- Martin, D. A., Muth, D. A., Brown, T., Johnson, A. J., Karabatsos, N., & Roehrig, J. T. (2000). Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(5), 1823–1826. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.5.1823-1826.2000>
- Martinet, J. P., Ferté, H., Failloux, A. B., Schaffner, F., & Depaquit, J. (2019). Mosquitoes of north-western europe as potential vectors of arboviruses: a review. *Viruses*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/V11111059>
- Martínez-De La Puente, J., Ferraguti, M., Ruiz, S., Roiz, D., Llorente, F., Pérez-Ramírez, E., Jiménez-Clavero, M. Á., Soriguer, R., & Figuerola, J. (2018). Mosquito community influences West Nile virus seroprevalence in wild birds: implications for the risk of spillover into human populations. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-20825-Z>
- Marzal, A., Ferraguti, M., Muriel, J., Magallanes, S., Ortiz, J. A., García-Longoria, L., Bravo-Barriga, D., Guerrero-Carvajal, F., Aguilera-Sepúlveda, P., Llorente, F., de Lope, F., Jiménez-Clavero, M., & Frontera, E. (2022). Circulation of zoonotic flaviviruses in wild passerine birds in Western Spain. *Veterinary Microbiology*, 268. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2022.109399>
- Mashimo, T., Lucas, M., Simon-Chazottes, D., Frenkiel, M. P., Montagutelli, X., Ceccaldi, P. E., Deubel, V., Guénet, J. L., & Desprès, P. (2002). A nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11311–11316. <https://doi.org/10.1073/PNAS.172195399>
- Mayer, S. v., Tesh, R. B., & Vasilakis, N. (2017). The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and Zika fevers. *Acta Tropica*, 166, 155–163. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2016.11.020>
- Mayordomo, S., Prieta, J., & Cardalliaguet, M. (2009). Aves de Extremadura.

- McGuill, M. W., & Rowan, A. N. (1989). Biological Effects of Blood Loss: Implications for Sampling Volumes and Techniques. *ILAR Journal*, 31(4), 5–20. <https://doi.org/10.1093/ILAR.31.4.5>
- Medlock, J. M., Snow, K. R., & Leach, S. (2007). Possible ecology and epidemiology of medically important mosquito-borne arboviruses in Great Britain. *Epidemiology and Infection*, 135(3), 466–482. <https://doi.org/10.1017/S0950268806007047>
- Medrouh, B., Lafri, I., Beck, C., Leulmi, H., Akkou, M., Abbad, L., Lafri, M., Bitam, I., & Lecollinet, S. (2020). First serological evidence of West Nile virus infection in wild birds in Northern Algeria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 69. <https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2020.101415>
- Michel, F., Sieg, M., Fischer, D., Keller, M., Eiden, M., Reuschel, M., Schmidt, V., Schwehn, R., Rinder, M., Urbaniak, S., Müller, K., Schmoock, M., Lühken, R., Groschup, M. H., & Ziegler, U. (2019). Infections in wild and resident birds in Germany, 2017 and 2018. *Viruses*, 11(7): 674. <httpS://doi.org/10.3390/v11070674>
- Mixão, V., Bravo Barriga, D., Parreira, R., Novo, M. T., Sousa, C. A., Frontera, E., Venter, M., Braack, L., & Almeida, A. P. G. (2016). Comparative morphological and molecular analysis confirms the presence of the West Nile virus mosquito vector, *Culex univittatus*, in the Iberian Peninsula. *Parasites & Vectors*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-016-1877-7>
- Molina, B., & Bermejo, A. (2003). *Amandava amandava*. Atlas de las Aves Reproductoras de España. Madrid: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Mossel, E. C., Crabtree, M. B., Mutebi, J. P., Lutwama, J. J., Borland, E. M., Powers, A. M., & Miller, B. R. (2017). Arboviruses isolated from mosquitoes collected in Uganda, 2008-2012. *Journal of Medical Entomology*, 54(5), 1403–1409. <https://doi.org/10.1093/JME/TJX120>
- Muerhoff, A. S., Dawson, G. J., Dille, B., Gutierrez, R., Leary, T. P., Gupta, M. C., Kyrk, C. R., Kapoor, H., Clark, P., Schochetman, G., & Desai, S. M. (2004). Enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant envelope protein expressed in COS-1 and Drosophila S2 cells for detection of West Nile virus immunoglobulin M in serum or cerebrospinal fluid. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(4), 651–657. <https://doi.org/10.1128/CDLI.11.4.651-657.2004>
- Muñoz, J., Ruiz, S., Soriguer, R., Alcaide, M., Viana, D. S., Roiz, D., Vázquez, A., & Figuerola, J. (2012). Feeding patterns of potential West Nile virus vectors in south-west Spain. *PloS One*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0039549>

- Murgue, B., Murri, S., Zientara, S., Durand, B., Durand, J. P., & Zeller, H. (2001). West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerging Infectious Diseases*, 7(4), 692. <https://doi.org/10.3201/eid0704.017417>
- Murray, K., Walker, C., Herrington, E., Lewis, J. A., McCormick, J., Beasley, D. W. C., Tesh, R. B., & Fisher-Hoch, S. (2010). Persistent infection with West Nile virus years after initial infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(1), 2–4. <https://doi.org/10.1086/648731>
- Nagy, A., Mezei, E., Nagy, O., Bakonyi, T., Csonka, N., Kaposi, M., Koroknai, A., Szomor, K., Rigó, Z., Molnár, Z., Dánielisz, Á., & Takács, M. (2019a). Extraordinary increase in West Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018. *Eurosurveillance*, 24(28). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.28.1900038>
- Napp, S., Llorente, F., Beck, C., Cunilleras, E.J., Soler, M., Pailler-garcía, L., Amaral, R., Aguilera-sepúlveda, P., Pifarré, M., Molina-lópez, R., Obón, E., Nicolás, O., Lecollinet, S., Jiménez-clavero, M. Á., & Busquets, N. (2021). Widespread circulation of flaviviruses in horses and birds in northeastern Spain (Catalonia) between 2010 and 2019. *Viruses*, 13(12), 2404. <https://doi.org/10.3390/V13122404/S1>
- Nasci, R. S., Gottfried, K. L., Burkhalter, K. L., Kulasekera, V. L., Lambert, A. J., Lanciotti, R. S., Hunt, A. R., & Ryan, J. R. (2002). Comparison of vero cell plaque assay, TaqMan reverse transcriptase polymerase chain reaction RNA assay, and VecTest antigen assay for detection of West Nile virus in field-collected mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 18(4), 294–300.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, USA
- Nemeth, N., Gould, D., Bowen, R., & Komar, N. (2006). Natural and experimental west Nile virus infection in five raptor species. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(1), 1–13. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.1.1>
- Nemeth, N. M., Oesterle, P. T., & Bowen, R. A. (2009). Humoral immunity to West Nile virus is long-lasting and protective in the house sparrow (*Passer domesticus*). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(5), 864. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.80.864>
- Ng T, Hathaway D, Jennings N, Champ D, Chiang YW, C. H. (2003). Equine vaccine for West Nile virus. *Journal of Developmental Biology*, 114, 221–227.
- Niedrig, M., Linke, S., Zeller, H., & Drosten, C. (2006). First international proficiency study on West Nile virus molecular detection. *Clinical Chemistry*, 52(10), 1851–1854. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2005.064451>

- Nikolay, B. (2015). A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: how much do transmission cycles overlap? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 109(10), 609–618. <https://doi.org/10.1093/TRSTMH/TRV066>
- Nikolay, B., Diallo, M., Boye, C. S. B., & Sall, A. A. (2011). Usutu virus in Africa. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 11(11), 1417–1423. <https://doi.org/10.1089/VBZ.2011.0631>
- Nikolay, B., Diallo, M., Faye, O., Boye, C. S., & Sall, A. A. (2012). Vector competence of *Culex neavei* (Diptera: Culicidae) for Usutu virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(6), 993–996. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.2012.11-0509>
- Nikolay, B., Dupressoir, A., Firth, C., Faye, O., Boye, C. S., Diallo, M., & Sall, A. A. (2013). Comparative full length genome sequence analysis of Usutu virus isolates from Africa. *Virology Journal*, 10, 217. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-217>
- Nowak, T., Färber, P. M., Wengler, G., & Wengler, G. (1989). Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology*, 169(2), 365–376. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90162-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90162-1)
- Ochieng, C., Lutomiah, J., Makio, A., Koka, H., Chepkorir, E., Yalwala, S., Mutisya, J., Musila, L., Khamadi, S., Richardson, J., Bast, J., Schnabel, D., Wurapa, E., & Sang, R. (2013). Mosquito-borne arbovirus surveillance at selected sites in diverse ecological zones of Kenya; 2007 - 2012. *Virology Journal*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-140/TABLES/1>
- Orshan, L., Bin, H., Schnur, H., Kaufman, A., Valinsky, A., Shulman, L., Weiss, L., Mendelson, E., & Pener, H. (2008). Mosquito vectors of West Nile Fever in Israel. *Journal of Medical Entomology*, 45(5), 939–947. <https://doi.org/10.1603/0022-2585>
- Ostlund, E. N., Crom, R. L., Pedersen, D. D., Johnson, D. J., Williams, W. O., & Schmitt, B. J. (2001). Equine West Nile encephalitis, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 7(4), 665–669. <https://doi.org/10.3201/EID0704.010412>
- Oude Munnink, B. B., Münger, E., Nieuwenhuijse, D. F., Kohl, R., van der Linden, A., Schapendonk, C. M. E., van der Jeugd, H., Kik, M., Rijks, J. M., Reusken, C. B. E. M., & Koopmans, M. (2020). Genomic monitoring to understand the emergence and spread of Usutu virus in the Netherlands, 2016–2018. *Scientific Reports*, 10(1), 2798. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59692-y>

- Pachler, K., Lebl, K., Berer, D., Rudolf, I., Hubalek, Z., & Nowotny, N. (2014). Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 20(12), 2119–2122. <https://doi.org/10.3201/EID2012.140921>
- Padgett, K. A., Cahoon-Young, B., Carney, R., Woods, L., Read, D., Husted, S., & Kramer, V. (2006). Field and laboratory evaluation of diagnostic assays for detecting West Nile virus in oropharyngeal swabs from California wild birds. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* (Larchmont, N.Y.), 6(2), 183–191. <https://doi.org/10.1089/VBZ.2006.6.183>
- Padrós, J. (1997). Culícids del Baix Llobregat (Diptera: Culicidae). *Faunística i Biologia. Barcelona (Spain)*.
- Pandit, P. S., Doyle, M. M., Smart, K. M., Young, C. C. W., Drape, G. W., & Johnson, C. K. (2018). Predicting wildlife reservoirs and global vulnerability to zoonotic Flaviviruses. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-018-07896-2>
- Papa, A. (2012). West Nile virus infections in Greece: an update. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(7), 743–750. <https://doi.org/10.1586/eri.12.59>
- Papa, A. (2013). West Nile virus infections in humans--focus on Greece. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 58(2), 351–353. <https://doi.org/10.1016/J.JCV.2013.02.020>
- Papa, A., Bakonyi, T., Xanthopoulou, K., Vázquez, A., Tenorio, A., & Nowotny, N. (2011). Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5), 920–922. <https://doi.org/10.3201/EID1705.101759>
- Papa, A., Danis, K., Baka, A., Bakas, A., Dougas, G., Lytras, T., Theocharopoulos, G., Chrysagis, D., Vassiliadou, E., Kamaria, F., Liona, A., Mellou, K., Saroglou, G., & Panagiotopoulos, T. (2010). Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July-August 2010. *EuroSurveillance*: 15(34), 1–5. <https://doi.org/10.2807/ESE.15.34.19644-EN>
- Papa, A., Papadopoulou, E., Gavana, E., Kalaitzopoulou, S., & Mourelatos, S. (2013). Detection of West Nile Virus Lineage 2 in *Culex* mosquitoes, Greece, 2012. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(9), 682–684. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1212>
- Papa, A., Xanthopoulou, K., Gewehr, S., & Mourelatos, S. (2011). Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of*

- Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17(8), 1176–1180.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03438.x>
- Papin, J. F., Vahrson, W., & Dittmer, D. P. (2004). SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for detection of West Nile Virus circumvents false-negative results due to strain variability. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1511–1518.
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1511-1518.2004>
- Parreira, R., & Sousa, C. A. (2015). Dengue fever in Europe: could there be an epidemic in the future? *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 13(1), 29–40.
<https://doi.org/10.1586/14787210.2015.982094>
- Patsoula, E., Beleri, S., Tegos, N., Mkrtisian, R., Vakali, A., & Pervanidou, D. (2020). Entomological Data and Detection of West Nile Virus in Mosquitoes in Greece (2014-2016), Before Disease Re-Emergence in 2017. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 20(1), 60–70. <https://doi.org/10.1089/VBZ.2018.2422>
- Pérez Ruiz, M., Sanbonmatsu Gámez, S., & Ángel Jiménez Clavero, M. (2011). Infección por virus West Nile. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(5), 21–26.
[https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70040-4](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70040-4)
- Pérez-Ramírez, E., Llorente, F., & Ángel Jiménez-Clavero, M. (2014). Experimental infections of wild birds with West Nile virus. *Viruses*, 6, 752–781.
<https://doi.org/10.3390/v6020752>
- Pérez-Ramírez, E., Llorente, F., del Amo, J., Fall, G., Sall, A. A., Lubisi, A., Lecollinet, S., Vázquez, A., & Jiménez-Clavero, M. Á. (2017). Pathogenicity evaluation of twelve West Nile virus strains belonging to four lineages from five continents in a mouse model: discrimination between three pathogenicity categories. *The Journal of General Virology*, 98(4), 662–670. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.000743>
- Pérez-Ramírez, E., Llorente, F., del Amo, J., Nowotny, N., & Jiménez-Clavero, M. Á. (2018). Susceptibility and role as competent host of the red-legged partridge after infection with lineage 1 and 2 West Nile virus isolates of Mediterranean and Central European origin. *Veterinary Microbiology*, 222(June), 39–45.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.06.012>
- Petersen, L. R. (2019). Epidemiology of West Nile Virus in the United States: Implications for Arbovirology and Public Health. *Journal of Medical Entomology*, 56(6), 1456–1462. <https://doi.org/10.1093/JME/TJZ085>
- Petersen, L. R., Brault, A. C., & Nasci, R. S. (2013). West Nile virus: Review of the literature. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 310(3), 308–315.
<https://doi.org/10.1001/jama.2013.8042>

- Petersen, L. R., Carson, P. J., Biggerstaff, B. J., Custer, B., Borchardt, S. M., & Busch, M. P. (2013). Estimated cumulative incidence of West Nile virus infection in US adults, 1999-2010. *Epidemiology and Infection*, 141(3), 591–595. <https://doi.org/10.1017/S0950268812001070>
- Petersen, L. R., & Marfin, A. A. (2002). West Nile virus: a primer for the clinician. *Annals of Internal Medicine*, 137(3), 173–179. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-137-3-200208060-00009>
- Petersen, L. R., Roehrig, J. T., & Hughes, J. M. (2002). West Nile virus encephalitis. *The New England Journal of Medicine*, 347(16), 1225–1226. <https://doi.org/10.1056/NEJMO020128>
- Phipps, P., Johnson, N., McElhinney, L. M., & Roberts, H. (2018). West Nile virus season in Europe. *The Veterinary Record*, 183(7), 224. <https://doi.org/10.1136/vr.k3497>
- Pichler, V., Caputo, B., Valadas, V., Micocci, M., Horvath, C., Virgillito, C., Akiner, M., Balatsos, G., Bender, C., Besnard, G., Bravo-Barriga, D., Bueno-Mari, R., Collantes, F., Delacour-Estrella, S., Dikolli, E., Falcuta, E., Flacio, E., García-Pérez, A. L., Kalan, K., ... della Torre, A. (2022). Geographic distribution of the V1016G knockdown resistance mutation in *Aedes albopictus*: a warning bell for Europe. *Parasites and Vectors*, 15(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/S13071-022-05407-3/TABLES/2>
- Pierro, A., Gaibani, P., Spadafora, C., Ruggeri, D., Randi, V., Parenti, S., Finarelli, A. C., Rossini, G., Landini, M. P., & Sambri, V. (2013). Detection of specific antibodies against West Nile and Usutu viruses in healthy blood donors in northern Italy, 2010-2011. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(10). <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12241>
- Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2020). The continued threat of emerging flaviviruses. *Nature Microbiology* 2020 5:6, 5(6), 796–812. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>
- Platonov, A. E., Shipulin, G. A., Shipulina, O. Y., Tyutyunnik, E. N., Frolochkina, T. I., Lanciotti, R. S., Yazyshina, S., Platonova, O. v., Obukhov, I. L., Zhukov, A. N., Vengerov, Y. Y., & Pokrovskii, V. I. (2001). Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerging Infectious Diseases*, 7(1), 128–132. <https://doi.org/10.3201/EID0701.010118>
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M., & Tordo, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *The EMBO Journal*, 8(12), 3867–3874. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1989.TB08565.X>

- Prilipov, A. G., Samokhvalov, E. I., L'vov, D. K., Gromashevskii, V. L., Butenko, A. M., Vyshemirskii, O. I., Larichev, V. F., Gaĭdamovich, S. I., Khutoretskaia, N. v, Voronina, A. G., Novikov, D. v, Mokhonov, V. v, & Al'khovskii, S. v. (2001). Genetic analysis of West Nile fever virus, isolated in the south of the Russian plain (Volgograd and Astrakhan regions) in 1999. *Voprosy Virusologii*, 46(1), 8–12.
- Prince, H. E., & Lapé-Nixon, M. (2005). Evaluation of a West Nile Virus Immunoglobulin A Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(1), 231. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.1.231-233.2005>
- Prince, H. E., Tobler, L. H., Lapé-Nixon, M., Foster, G. A., Stramer, S. L., & Busch, M. P. (2005). Development and persistence of West Nile virus-specific immunoglobulin M (IgM), IgA, and IgG in viremic blood donors. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4316–4320. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4316-4320.2005>
- Puggioli, A., Bonilauri, P., Calzolari, M., Lelli, D., Carrieri, M., Urbanelli, S., Pudar, D., & Bellini, R. (2017). Does *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) play any role in Usutu virus transmission in Northern Italy? Experimental oral infection and field evidences. *Acta Tropica*, 172, 192–196. <https://doi.org/10.1016/j.ACTATROPICA.2017.05.006>
- Pulgarín, P. C., Gómez, J. P., Robinson, S., Ricklefs, R. E., & Cadena, C. D. (2018). Host species, and not environment, predicts variation in blood parasite prevalence, distribution, and diversity along a humidity gradient in northern South America. *Ecology and Evolution*, 8(8), 3800–3814. <https://doi.org/10.1002/ECE3.3785>
- Randall, N. J., Blitvich, B. J., & Blanchong, J. A. (2012). EFFICACY OF WILDLIFE rehabilitation centers in surveillance and monitoring of pathogen activity: a case study with West Nile virus. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(3), 646–653. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.3.646>
- Ravagnan, S., Montarsi, F., Cazzin, S., Porcellato, E., Russo, F., Palei, M., Monne, I., Savini, G., Marangon, S., Barzon, L., & Capelli, G. (2015). First report outside Eastern Europe of West Nile virus lineage 2 related to the Volgograd 2007 strain, northeastern Italy, 2014. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1031-y>
- Rice, C. M., Aebersold, R., Teplow, D. B., Pata, J., Bell, J. R., Vance Vorndam, A., Trent, D. W., Brandriss, M. W., Schlesinger, J. J., & Strauss, J. H. (1986). Partial N-terminal amino acid sequences of three nonstructural proteins of two flaviviruses. *Virology*, 151(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90098-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90098-X)
- Richards, S. L., Ponnusamy, L., Unnasch, T. R., Hassan, H. K., & Apperson, C. S. (2006). Host-Feeding Patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Relation to Availability of Human and Domestic Animals in Suburban Landscapes of Central

- North Carolina. *Journal of Medical Entomology*, 43(3), 543. <https://doi.org/10.1603/0022-2585>
- Richter, J., Tryfonos, C., Tourvas, A., Floridou, D., Paphitou, N. I., & Christodoulou, C. (2017). Complete Genome Sequence of West Nile Virus (WNV) from the First Human Case of Neuroinvasive WNV Infection in Cyprus. *Genome Announcements*, 5(43). <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.01110-17>
- Rios, J. J., Fleming, J. A. G. W., Bryant, U. K., Carter, C. N., Huber, J. C., Long, M. T., Spencer, T. E., & Adelson, D. L. (2010). OAS1 Polymorphisms are associated with susceptibility to West Nile encephalitis in horses. *PLOS ONE*, 5(5), e10537. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010537>
- Rizzoli, A., Jiménez-Clavero, M. A., Barzon, L., Cordioli, P., Figuerola, J., Koraka, P., Martina, B., Moreno, A., Nowotny, N., Pardigon, N., Sanders, N., Ulbert, S., & Tenorio, A. (2015b). The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities. *EuroSurveillance*: 20(20). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.20.21135>
- Rodríguez, G. (2010). Models for over-dispersed count data Generalized Linear Models. *Princeton University*.
- Rodríguez-Alarcón, L. G. S. M., Fernández-Martínez, B., Moros, M. J. S., Vázquez, A., Pachés, P. J., Villaceros, E. G., Martín, M. B. G., Borrás, J. F., Lorusso, N., Aceitero, J. M. R., Moro, E., de Celis, A., Oyonarte, S., Mahillo, B., González, L. J. R., Sánchez-Seco, M. P., Rodríguez, B. S., Catalán, U. A., Contreras, S. R., ... Soria, F. S. (2021). Unprecedented increase of West Nile virus neuroinvasive disease, Spain, summer 2020. *Eurosurveillance*, 26(19), 2002010. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.19.2002010/CITE/PLAINTEXT>
- Roehrig, J. T., Layton, M., Smith, P., Campbell, G. L., Nasci, R., & Lanciotti, R. S. (2002). The emergence of West Nile virus in North America: ecology, epidemiology, and surveillance. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 267, 223–240. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59403-8_11
- Roehrig, J. T., Nash, D., Maldin, B., Labowitz, A., Martin, D. A., Lanciotti, R. S., & Campbell, G. L. (2003). Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin m antibody in confirmed West Nile virus encephalitis cases. *Emerging Infectious Diseases*, 9(3), 376–379. <https://doi.org/10.3201/EID0903.020531>
- Roesch, F., Fajardo, A., Moratorio, G., & Vignuzzi, M. (2019). Usutu Virus: An arbovirus on the Rise. *Viruses* 11(7): 640. <https://doi.org/10.3390/v11070640>
- Roiz, D., Roussel, M., Muñoz, J., Ruiz, S., Soriguer, R., & Figuerola, J. (2012). Efficacy of mosquito traps for collecting potential west Nile mosquito vectors in a natural

- Mediterranean wetland. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(4), 642. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.2012.11-0326>
- Roiz, D., Ruiz, S., Soriguer, R., & Figuerola, J. (2015). Landscape effects on the presence, abundance and diversity of mosquitoes in Mediterranean wetlands. *PloS One*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0128112>
- Roiz, D., Vázquez, A., Ruiz, S., Tenorio, A., Soriguer, R., & Figuerola, J. (2019). Evidence that passerine birds act as amplifying hosts for Usutu virus circulation. *EcoHealth*, 16(4), 734–742. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01441-3>
- Rossi, S. L., Ross, T. M., & Evans, J. D. (2010). West Nile Virus. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1), 47. <https://doi.org/10.1016/J.CLL.2009.10.006>
- Rushton, J. O., Lecollinet, S., Hubálek, Z., Svobodová, P., Lussy, H., & Nowotny, N. (2013). Tick-borne encephalitis virus in horses, Austria, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, 19(4), 635–637. <https://doi.org/10.3201/EID1904.121450>
- Saegerman, C., Alba-Casals, A., García-Bocanegra, I., Dal Pozzo, F., & van Galen, G. (2016). Clinical Sentinel Surveillance of Equine West Nile Fever, Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(2), 184–193. <https://doi.org/10.1111/tbed.12243>
- Salazar, P., Traub-Dargatz, J. L., Morley, P. S., Wilmot, D. D., Steffen, D. J., Cunningham, W. E., & Salman, M. D. (2004). Outcome of equids with clinical signs of West Nile virus infection and factors associated with death. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225(2), 267–274. <https://doi.org/10.2460/JAVMA.2004.225.267>
- Samanidou-Voyadjoglou, A., & Darsie, R. F. (1993). New country records for mosquito species in Greece. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 9(4), 465–466.
- Sánchez-Gómez, A., Amela, C., Fernández-Carrión, E., Martínez-Avilés, M., Sánchez-Vizcaíno, J. M., & Sierra-Moros, M. J. (2017). Risk mapping of West Nile virus circulation in Spain, 2015. *Acta Tropica*, 169, 163–169. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2017.02.022>
- Sánchez-Seco, M. P., & Navarro, J. M. (2005). Infecciones por el virus de Toscana, el virus del Nilo occidental y otros arbovirus de interés en Europa. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(9), 560–568. <https://doi.org/10.1157/13080267>
- Sánchez-Seco, M. P., Rosario, D., Domingo, C., Hernández, L., Valdés, K., Guzmán, M. G., & Tenorio, A. (2005). Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific

- identification. *Journal of Virological Methods*, 126(1–2), 101–109.
<https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2005.01.025>
- Sanchini, A., Donoso-Mantke, O., Papa, A., Sambri, V., Teichmann, A., & Niedrig, M. (2013). Second international diagnostic accuracy study for the serological detection of West Nile virus infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(4).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0002184>
- Santos, P. D., Michel, F., Wylezich, C., Höper, D., Keller, M., Holicki, C. M., Szentiks, C. A., Eiden, M., Muluneh, A., Neubauer-Juric, A., Thalheim, S., Globig, A., Beer, M., Groschup, M. H., & Ziegler, U. (2022). Co-infections: Simultaneous detections of West Nile virus and Usutu virus in birds from Germany. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(2), 776–792. <https://doi.org/10.1111/TBED.14050>
- Saravia Campelli, G., García San Miguel Rodríguez-Alarcón, L., Aznar Cano, E., Sierra Moros, M.j., Suarez Rodríguez, B. & Simón Soria, F. (2022). *Evaluación rápida de riesgo Otros expertos y filiación*.
https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/docs/20221018_ERR_Nilo_Occidental.pdf
- Savage, H. M., Ceianu, C., Nicolescu, G., Karabatsos, N., Lanciotti, R., Vladimirescu, A., Laiv, L., Ungureanu, A., Romanca, C., & Tsai, T. F. (1999). Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(4), 600–611.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.600>
- Savini, G., Capelli, G., Monaco, F., Polci, A., Russo, F., di Gennaro, A., Marini, V., Teodori, L., Montarsi, F., Pinoni, C., Piscicella, M., Terregino, C., Marangon, S., Capua, I., & Lelli, R. (2012). Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy. *Veterinary Microbiology*, 158(3–4), 267–273.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.02.018>
- Savini, G., Monaco, F., Terregino, C., Di Gennaro, A., Bano, L., Pinoni, C., De Nardi, R., Bonilauri, P., Pecorari, M., Di Gialleonardo, L., Bonfanti, L., Polci, A., Calistri, P., & Lelli, R. (2011). Usutu virus in Italy: *An emergence or a silent infection?* 151, 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.036>
- Schuler, L. A., Khaitisa, M. L., Dyer, N. W., & Stoltenow, C. L. (2004). Evaluation of an outbreak of West Nile virus infection in horses: 569 cases (2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225(7), 1084–1089.
<https://doi.org/10.2460/JAVMA.2004.225.1084>

- Schweitzer, B. K., Chapman, N. M., & Iwen, P. C. (2009). Overview of the Flaviviridae with an emphasis on the Japanese Encephalitis Group Viruses. *Laboratory Medicine*, 40(8), 493–499. <https://doi.org/10.1309/LM5YWS85NJPCWESW>
- Scott Weese, J., Baird, J. D., DeLay, J., Kenney, D. G., Staempfli, H. R., Viel, L., Parent, J., Smith-Maxie, L., & Poma, R. (2003). West Nile virus encephalomyelitis in horses in Ontario: 28 cases. *The Canadian Veterinary Journal*, 44(6), 469. PMC340169
- Seidowski, D., Ziegler, U., von Rönn, J. A. C., Müller, K., Hüppop, K., Müller, T., Freuling, C., Mühle, R.-U., Nowotny, N., Ulrich, R. G., Niedrig, M., & Groschup, M. H. (2010). West Nile Virus Monitoring of Migratory and Resident Birds in Germany. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(7), 639–647. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0236>
- Sejvar, J. J., Haddad, M. B., Tierney, B. C., Campbell, G. L., Marfin, A. A., van Gerpen, J. A., Fleischauer, A., Leis, A. A., Stokic, D. S., & Petersen, L. R. (2003). Neurologic manifestations and outcome of West Nile virus infection. *JAMA*, 290(4), 511–515. <https://doi.org/10.1001/JAMA.290.4.511>
- Selim, A., Megahed, A., Kandeel, S., Alouffi, A., & Almutairi, M. M. (2021). West Nile virus seroprevalence and associated risk factors among horses in Egypt. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00449-6>
- Semenza, J. C., & Suk, J. E. (2018). Vector-borne diseases and climate change: a European perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 365(2). <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNX244>
- Sherpa, S., Blum, M. G. B., Capblancq, T., Cumer, T., Rioux, D., & Després, L. (2019). Unravelling the invasion history of the Asian tiger mosquito in Europe. *Molecular Ecology*, 28(9), 2360–2377. <https://doi.org/10.1111/MEC.15071>
- Shi, P. Y., Kauffman, E. B., Ren, P., Felton, A., Tai, J. H., Dupuis, A. P., Jones, S. A., Ngo, K. A., Nicholas, D. C., Maffei, J., Ebel, G. D., Bernard, K. A., & Kramer, L. D. (2001). High-throughput detection of West Nile virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4), 1264–1271. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1264-1271.2001>
- Shrestha, B., & Diamond, M. S. (2004). Role of CD8+ T Cells in Control of West Nile Virus Infection. *Journal of Virology*, 78(15), 8312. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.8312-8321.2004>
- Sikkema, R. S., Schrama, M., van den Berg, T., Morren, J., Munger, E., Krol, L., van DerBeek, J. G., Blom, R., Chestakova, I., van der Linden, A., Boter, M., van Mastrigt, T., Molenkamp, R., Koenraadt, C. J. M., van den Brand, J. M. A., Munnink, B. B. O., Koopmans, M. P. G., & van der Jeugd, H. (2020). Detection of West Nile virus in a common whitethroat (*Curruca communis*) and *Culex* mosquitoes in the

- Netherlands, 2020. *Eurosurveillance*, 25(40), 1–6. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.40.2001704/CITE/PLAINTEXT>
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature* 199 163:4148 688–688. <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Smit, J. M., Moesker, B., Rodenhuis-Zybert, I., & Wilschut, J. (2011). Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses*, 3(2), 160–171. <https://doi.org/10.3390/V3020160>
- Smithburn, K. C., Hughes, T. P., Burke, A. W., & Paul, J. H. (1940). A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1-20(4), 471–492. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1940.S1-20.471>
- Snoeck, C. J., Sausy, A., Losch, S., Wildschutz, F., Bourg, M., & Hübschen, J. M. (2022). Usutu Virus Africa 3 Lineage, Luxembourg, 2020. *Emerging Infectious Diseases*, 28(5), 1076. <https://doi.org/10.3201/EID2805.212012>
- Solomon, T., Ooi, M. H., Beasley, D. W. C., & Mallewa, M. (2003). West Nile encephalitis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 326(7394), 865–869. <https://doi.org/10.1136/BMJ.326.7394.865>
- Sotelo, E., Fernández-Pinero, J., & Jiménez-Clavero, M. Á. (2012). West Nile fever/encephalitis: re-emergence in Europe and the situation in Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(2), 75–83. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2011.09.002>
- Sotelo, E., Llorente, F., Rebollo, B., Camuñas, A., Venteo, A., Gallardo, C., Lubisi, A., Rodríguez, M. J., Sanz, A. J., Figuerola, J., & Jiménez-Clavero, M. Á. (2011). Development and evaluation of a new epitope-blocking ELISA for universal detection of antibodies to West Nile virus. *Journal of Virological Methods*, 174(1–2), 35–41. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2011.03.015>
- Steinman, A., Banet, C., Sutton, G. A., Yadin, H., Hadar, S., & Brill, A. (2002). Clinical signs of West Nile virus encephalomyelitis in horses during the outbreak in Israel in 2000. *The Veterinary Record*, 151(2), 47–49. <https://doi.org/10.1136/VR.151.2.47>
- Steinmetz, H. W., Bakonyi, T., Weissenböck, H., Hatt, J. M., Eulenberger, U., Robert, N., Hoop, R., & Nowotny, N. (2011). Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, Switzerland--genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks. *Veterinary Microbiology*, 148(2–4), 207–212. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2010.09.018>

- Stejskalova, K., Cvanova, M., Oppelt, J., Janova, E., Horecky, C., Horecka, E., Knoll, A., Leblond, A., & Horin, P. (2019). Genetic susceptibility to West Nile virus infection in Camargue horses. *Research in Veterinary Science*, 124, 284–292. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2019.04.004>
- Stephan W.A., Kolodziejek, J., Jungbauer, C., Stiasny, K., Judith H.A., Alexander Zoufaly, A., Hourfar, M.K., Weidner, L & Nowotny, N. (2018). Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. *Eurosurveillance*, 23(43). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.43.1800545>
- Stephens, P. R., Altizer, S., Smith, K. F., Alonso Aguirre, A., Brown, J. H., Budischak, S. A., Byers, J. E., Dallas, T. A., Jonathan Davies, T., Drake, J. M., Ezenwa, V. O., Farrell, M. J., Gittleman, J. L., Han, B. A., Huang, S., Hutchinson, R. A., Johnson, P., Nunn, C. L., Onstad, D., ... Poulin, R. (2016). The macroecology of infectious diseases: a new perspective on global-scale drivers of pathogen distributions and impacts. *Ecology Letters*, 19(9), 1159–1171. <https://doi.org/10.1111/ELE.12644>
- Stiasny, K., Aberle, S. W., & Heinzl, F. X. (2013). Retrospective identification of human cases of West Nile virus infection in Austria (2009 to 2010) by serological differentiation from Usutu and other flavivirus infections. *Eurosurveillance*, 18(43), 20614. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.43.20614/CITE/PLAINTEXT>
- Sutherst, R. W. (2004). Global Change and Human Vulnerability to Vector-Borne Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 136. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.136-173.2004>
- Svensson, L., Mullarney, K., & Zetterström, D. (2010). *Guía de aves: España, Europa y región mediterránea*. Ed: Omega.
- Tabachnick, W. J. (2013). Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(1), 249–277. <https://doi.org/10.3390/IJERPH10010249>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSR121>
- Tardei, G., Ruta, S., Chitu, V., Rossi, C., Tsai, T. F., & Cernescu, C. (2000). Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile Virus infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(6), 2232–2239. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.6.2232-2239.2000>

- Taylor, R. M., Hurlbut, H. S., Dressler, H. R., Spangler, E. W., & Thrasher, D. (1953). Isolation of West Nile virus from *Culex* mosquitoes. *The Journal of the Egyptian Medical Association*, 36(3), 199–208.
- Tber A.A. (1996). *West Nile fever in horses in Morocco*. Bulletin De l'Office International des Epizooties. 11, 867-869
- Tesh, R. B., Travassos da Rosa, A. P. A., Guzman, H., Araujo, T. P., & Xiao, S. Y. (2002). Immunization with heterologous flaviviruses protective against fatal West Nile encephalitis. *Emerging Infectious Diseases*, 8(3), 245–251. <https://doi.org/10.3201/EID0803.010238>
- Timmermann, U., & Becker, N. (2010). Mosquito-borne West Nile virus (WNV) surveillance in the Upper Rhine Valley, Germany. *Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology*, 35(1), 140–143. <https://doi.org/10.1111/J.1948-7134.2010.00039.X>
- Tolsá, M. J., García-Peña, G. E., Rico-Chávez, O., Roche, B., & Suzán, G. (2018). Macroecology of birds potentially susceptible to West Nile virus. *Proceedings. Biological Sciences*, 285(1893). <https://doi.org/10.1098/RSPB.2018.2178>
- Tolsá-García, M. J., Wehmeyer, M. L., Lühken, R., & Roiz, D. (2023). Worldwide transmission and infection risk of mosquito vectors of West Nile, St. Louis encephalitis, Usutu and Japanese encephalitis viruses: a systematic review. *Scientific Reports* 2023 13:1, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-27236-1>
- Tonry, J. H., Xiao, S.-Y., Siirin, M., Chen, H., da Rosa, A. P. A. T., & Tesh, R. B. (2005). Persistent shedding of West Nile virus in urine of experimentally infected hamsters. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(3), 320–324.
- Traore-Lamizana, M., Zeller, H. G., Mondo, M., Hervy, J. P., Adam, F., & Digoutte, J. P. (1994). Isolations of West Nile and Bagaza viruses from mosquitoes (Diptera: Culicidae) in central Senegal (Ferlo). *Journal of Medical Entomology*, 31(6), 934–938. <https://doi.org/10.1093/JMEDENT/31.6.934>
- Tsai, T. F., Popovici, F., Cernescu, C., Campbell, G. L., & Nedelcu, N. I. (1998). West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet*, 352(9130), 767–771. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)03538-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)03538-7)
- Ulbert, S. (2011). West Nile virus: the complex biology of an emerging pathogen. *Intervirology*, 54(4), 171–184. <https://doi.org/10.1159/000328320>
- Vanhomwegen, J., Beck, C., Desprès, P., Figuerola, A., García, R., Lecollinet, S., López-Roig, M., Manuguerra, J. C., & Serra-Cobo, J. (2017). Circulation of zoonotic

- arboviruses in equine populations of Mallorca island (Spain). *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 17(5), 340–346. <https://doi.org/10.1089/VBZ.2016.2042>
- Vázquez, A., Sánchez-Seco, M. P., Ruiz, S., Molero, F., Hernández, L., Moreno, J., Magallanes, A., Tejedor, C. G., & Tenorio, A. (2010). Putative new lineage of west Nile virus, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 16(3), 549–552. <https://doi.org/10.3201/EID1603.091033>
- Vázquez, A., Jiménez-Clavero, M. A., Franco, L., Donoso-Mantke, O., Sambri, V., Niedrig, M., Zeller, H., & Tenorio, A. (2011a). Usutu virus - Potential risk of human disease in Europe. *Eurosurveillance*, 16(31), 1–5. <https://doi.org/10.2807/ese.16.31.19935-en>
- Vázquez, A., Ruiz, S., Herrero, L., Moreno, J., Molero, F., Magallanes, A., Sánchez-Seco, M. P., Figuerola, J., & Tenorio, A. (2011b). West Nile and Usutu viruses in mosquitoes in Spain, 2008-2009. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(1), 178–181. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.2011.11-0042>
- Velasco, M., Sánchez-Seco, M. P., Campelo, C., de Ory, F., Martin, O., Herrero, L., Béliz, O. J. S., Minguito, T., Campos, M. C., Molero, F., Algara, A., & Vázquez, A. (2020). Imported Human West Nile Virus Lineage 2 Infection in Spain: Neurological and Gastrointestinal Complications. *Viruses*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/V12020156>
- Venter, M., Human, S., Zaayman, D., Gerdes, G. H., Williams, J., Steyl, J., Leman, P. A., Paweska, J. T., Setzkorn, H., Rous, G., Murray, S., Parker, R., Donnellan, C., & Swanepoel, R. (2009). Lineage 2 West Nile virus as cause of fatal neurologic disease in horses, South Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 15(6), 877. <https://doi.org/10.3201/EID1506.081515>
- Veo, C., della Ventura, C., Moreno, A., Rovida, F., Percivalle, E., Canziani, S., Torri, D., Calzolari, M., Baldanti, F., Galli, M., & Zehender, G. (2019). Evolutionary dynamics of the lineage 2 West Nile virus that caused the largest European epidemic: Italy 2011-2018. *Viruses*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/V11090814>
- Verstrepen, B. E., Fagrouch, Z., van Heteren, M., Buitendijk, H., Haaksma, T., Beenhakker, N., Palù, G., Richner, J. M., Diamond, M. S., Bogers, W. M., Barzon, L., Chabierski, S., Ulbert, S., Kondova, I., & Verschoor, E. J. (2014). Experimental infection of rhesus macaques and common marmosets with a European strain of West Nile virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0002797>
- Vidaña, B., Busquets, N., Napp, S., Pérez-Ramírez, E., Jiménez-Clavero, M. Á., & Johnson, N. (2020). The role of birds of prey in West Nile virus epidemiology. *Vaccines*, 8(3), 1–32. <https://doi.org/10.3390/VACCINES8030550>

- Vilibic-Cavlek, T., Petrovic, T., Savic, V., Barbic, L., Tabain, I., Stevanovic, V., Klobucar, A., Mrzljak, A., Ilic, M., Bogdanic, M., Benven, I., Santini, M., Capak, K., Monaco, F., Listes, E., & Savini, G. (2020). Epidemiology of Usutu Virus: The European Scenario. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 9(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9090699>
- Vilibic-Cavlek, T., Savic, V., Petrovic, T., Toplak, I., Barbic, L., Petric, D., Tabain, I., Hrnjakovic-Cvjetkovic, I., Bogdanic, M., Klobucar, A., Mrzljak, A., Stevanovic, V., Dinjar-Kujundzic, P., Radmanic, L., Monaco, F., Listes, E., & Savini, G. (2019). Emerging trends in the epidemiology of West Nile and Usutu virus Infections in Southern Europe. *Frontiers in Veterinary Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2019.00437>
- Vilibic-Cavlek, T., Savic, V., Sabadi, D., Peric, L., Barbic, L., Klobucar, A., Miklausic, B., Tabain, I., Santini, M., Vucelja, M., Dvorski, E., Butigan, T., Kolaric-Sviben, G., Potocnik-Hunjadi, T., Balenovic, M., Bogdanic, M., Andric, Z., Stevanovic, V., Capak, K., ... Savini, G. (2019). Prevalence and molecular epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in Croatia in the “One health” context, 2018. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(5), 1946–1957. <https://doi.org/10.1111/TBED.13225>
- Villarán, A. (2021). Ruiseñor común – *Luscinia megarhynchos* (Brehm, 1831). <https://doi.org/10.20350/DIGITALCSIC/14002>
- Vogels, C. B. F., Göertz, G. P., Pijlman, G. P., & Koenraadt, C. J. M. (2017). Vector competence of European mosquitoes for West Nile virus. *Emerging Microbes & Infections*, 6(11). <https://doi.org/10.1038/EMI.2017.82>
- Vojtíšek, J., Pečta, R., Kejíková, R., Hubálek, Z., Šikutová, S., & Rudolf, I. (2022). Usutu virus, another emerging mosquito-borne pathogen in Central Europe. *Military Medical Science Letters*, 91(1), 51–64. <https://doi.org/10.31482/MMSL.2021.031>
- Ward, M. P., Levy, M., Thacker, H. L., Ash, M., Norman, S. K. L., Moore, G. E., & Webb, P. W. (2004). Investigation of an outbreak of encephalomyelitis caused by West Nile virus in 136 horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 225(1), 84–89. <https://doi.org/10.2460/JAVMA.2004.225.84>
- Ward, M. P., Schuermann, J. A., Highfield, L. D., & Murray, K. O. (2006). Characteristics of an outbreak of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. *Veterinary Microbiology*, 118(3–4), 255–259. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2006.07.016>
- Weidinger, P., Kolodziejek, J., Bakonyi, T., Brunthaler, R., Erdélyi, K., Weissenböck, H., & Nowotny, N. (2020). Different dynamics of Usutu virus infections in Austria and

- Hungary, 2017–2018. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(1), 298.
<https://doi.org/10.1111/TBED.13351>
- Weinberger, M., Pitlik, S. D., Gandacu, D., Lang, R., Nassar, F., ben David, D., Rubinstein, E., Izthaki, A., Mishal, J., Kitzes, R., Siegman-Igra, Y., Giladi, M., Pick, N., Mendelson, E., Bin, H., Shohat, T., & Chowers, M. Y. (2001). West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects. *Emerging Infectious Diseases*, 7(4), 686–691.
<https://doi.org/10.3201/EID0704.010416>
- Weissenböck, H., Bakonyi, T., Rossi, G., Mani, P., & Nowotny, N. (2013). Usutu Virus, Italy, 1996. *Emerging Infectious Diseases*, 19(2), 274.
<https://doi.org/10.3201/EID1902.121191>
- Weissenböck, H., Kolodziejek, J., Url, A., Lussy, H., Rebel-Bauder, B., & Nowotny, N. (2002). Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne Flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 8(7), 652–656. <https://doi.org/10.3201/eid0807.020094>
- Wen, Y., Muir, L. E., & Kay, B. H. (1997). Response of *Culex quinquefasciatus* to visual stimuli. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13(2), 150–152.
- Wendell, M. D., Sleeman, J. M., & Kratz, G. (2002). Retrospective study of morbidity and mortality of raptors admitted to Colorado State University veterinary teaching hospital during 1995 to 1998. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(1), 101–106.
<https://doi.org/10.7589/0090-3558-38.1.101>
- Werner, D., Kronefeld, M., Schaffner, F., & Kampen, H. (2012). Two invasive mosquito species, *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus japonicus*, trapped in south-west Germany, July to August 2011. *EuroSurveillance*: 17(4).
<https://doi.org/10.2807/ESE.17.04.20067-EN>
- Westaway, E. G., Della-Porta, A. J., & Reedman, B. M. (1974). Specificity of IgM and IgG antibodies after challenge with antigenically related togaviruses. *Journal of Immunology* 112(2), 656–663.
- Williams, C. J., & Moffitt, C. M. (2001). A Critique of Methods of Sampling and Reporting Pathogens in Populations of Fish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13(4), 300–309.
<https://doi.org/10.1577/1548-8667>
- Wilson, E. B. (1927). Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference. *Journal of the American Statistical Association*, 22(158), 209–212.
<https://doi.org/10.1080/01621459.1927.10502953>

- Wilson, J. R., de Sessions, P. F., Leon, M. A., & Scholle, F. (2008). West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction. *Journal of Virology*, 82(17), 8262–8271. <https://doi.org/10.1128/JVI.00226-08>
- Wipf, N. C., Guidi, V., Tonolla, M., Ruinelli, M., Müller, P., & Engler, O. (2019). Evaluation of honey-baited FTA cards in combination with different mosquito traps in an area of low arbovirus prevalence. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S13071-019-3798-8/FIGURES/4>
- WOAH. (2022a). *West Nile fever* - WOA - World Organisation for Animal Health. <https://www.woah.org/en/disease/west-nile-fever/>
- WOAH. (2022b). *West Nile Fever*. IN: *Terrestrial Manual* - WOA - World Organisation for Animal Health. <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>
- Wong, S. J., Boyle, R. H., Demarest, V. L., Woodmansee, A. N., Kramer, L. D., Li, H., Drebot, M., Koski, R. A., Fikrig, E., Martin, D. A., & Shi, P. Y. (2003). Immunoassay targeting nonstructural protein 5 to differentiate West Nile virus infection from dengue and St. Louis encephalitis virus infections and from flavivirus vaccination. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4217–4223. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4217-4223.2003>
- Wong, S. J., Demarest, V. L., Boyle, R. H., Wang, T., Ledizet, M., Kar, K., Kramer, L. D., Fikrig, E., & Koski, R. A. (2004). Detection of human anti-flavivirus antibodies with a West Nile virus recombinant antigen microsphere immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 65–72. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.65-72.2004>
- Woodall, J. (1964). The viruses isolated from arthropods at the East African. *Virus Research Institute in the 26 Years Ending December 1963, Pro E Afric Acad II*, 141–146.
- World Health Organization. (2020). *Vector-borne diseases*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- Yan, J., Gangoso, L., Martínez-de la Puente, J., Soriguer, R., & Figuerola, J. (2017). Avian phenotypic traits related to feeding preferences in two *Culex* mosquitoes. *Science of Nature*, 104(9–10). <https://doi.org/10.1007/s00114-017-1497-x>
- Zannoli, S., & Sambri, V. (2019). West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: Epidemiology and Implications. *Microorganisms*, 7(7). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7070184>
- Zeller, H. G., & Schuffenecker, I. (2004). West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas.

European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 23(3), 147–156.
<https://doi.org/10.1007/s10096-003-1085-1>

Ziegler, U., Fast, C., Eiden, M., Bock, S., Schulze, C., Hoeper, D., Ochs, A., Schlieben, P., Keller, M., Zielke, D. E., Luehken, R., Cadar, D., Walther, D., Schmidt-Chanasit, J., & Groschup, M. H. (2016). Evidence for an independent third Usutu virus introduction into Germany. *Veterinary Microbiology*, 192, 60–66.
<https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2016.06.007>

Ziegler, U., Seidowski, D., Angenvoort, J., Eiden, M., Müller, K., Nowotny, N., & Groschup, M. H. (2012). Monitoring of West Nile virus infections in Germany. *Zoonoses and Public Health*, 59(2), 95–101. <https://doi.org/10.1111/ZPH.12015>

Zuur, A. F., Ieno, E. N., & Elphick, C. S. (2010). A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*, 1(1), 3–14.
<https://doi.org/10.1111/j.2041-210x.2009.00001.x>