





## *Il melting pot virale è sul pelo dell'acqua*

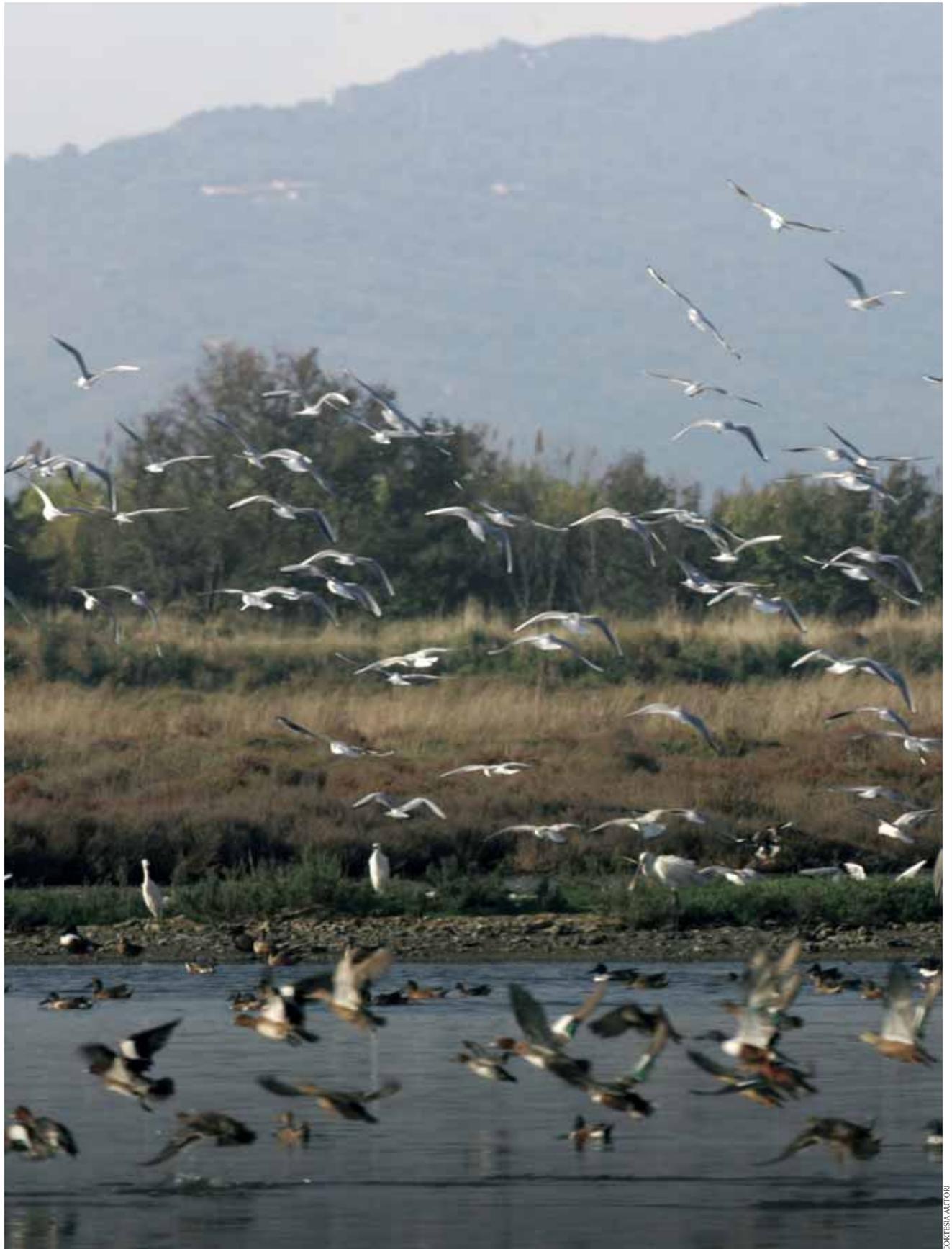
Il serbatoio che consente ai virus influenzali di perpetuarsi nel tempo è costituito dalle anatre selvatiche, che contraggono l'infezione e la trasmettono ad altre specie anche in mancanza di un contatto diretto

MAURO DELOGU, MARIA ALESSANDRA DE MARCO, ISABELLA DONATELLI

**L**A FILOGENESI DEI VIRUS INFLUENZALI ha premiato dal punto di vista evolutivo la possibilità di possedere un genoma segmentato. Tale condizione, negli *Orthomyxovirus* di tipo A è caratterizzata dalla presenza di 8 segmenti liberi di RNA lineare a singola elica e a polarità negativa. Da un punto di vista funzionale ogni singolo segmento del genoma virale codifica una specifica abilità del virus, ad esempio l'adesione all'ospite e la fuga dal sistema immunitario per l'emoagglutinina, il distacco dalle cellule infettate per la neuramminidasi, l'efficienza di replicazione per il gruppo delle polimerasi (PB1, PB2, PA). Queste capacità condizionano grandemente le potenzialità adattative che tali virus manifestano quale risposta alla pressione selettiva, sia attraverso meccanismi di mutazione spontanea minore (drift antigenico) sia attraverso la possibilità di subire un riassortimento genetico in concomitanza di situazioni di confezione (shift, ricombinazione).

In questo senso gli aspetti macroevolutivi del virus (evoluzione divergente) offrono allo stesso notevoli capacità adattative esplicabili istantaneamente nel microtempo con il susseguirsi delle generazioni virali<sup>4</sup>. I virus a RNA sono infatti microrganismi che, rapportati agli altri esseri viventi, esprimono la massima capacità di mutazione potendo manifestare una mutazione per genoma per replicazione e arrivando a produrre fino a 100.000 copie virali in 10 ore per un totale approssimativo di 1.012 particelle virali in un organismo infetto<sup>11</sup>. Tale potenzialità di mutazione inserita nel tempo evolutivo dell'ospite (macrotempo) si traduce in un vantaggio evolutivo del virus sullo stesso. Solamente nel macrotempo quindi si raggiunge quell'equilibrio che, attraverso un fenomeno di evoluzione convergente, prende il nome di coevoluzione adattativa, elemento portante sia nel condizionare il rapporto tra virus influenzale e le diverse specie ospiti, sia nel definire i ruoli epidemiologici delle specie serbatoio o di ospite non adattato<sup>9</sup>.

Tra gli elementi condizionanti la capacità di infettare e di ammalare singole specie delle quasi 400 costituenti l'avifauna selvatica italiana, alcuni sono prettamente di pertinenza del virus quali la presenza di amminoacidi basici multipli nel sito di taglio dell'emoagglutinina, la presenza di siti di glicosilazione aggiuntivi e le delezioni dello stalk della neuramminidasi. Altri invece sono legati a caratteristiche strutturali della specie ospite, quali la presenza e la distribuzione di



CORTESIA APTORI

Stormo di migratori in volo nell'oasi del Wwf di Orbetello, in provincia di Grosseto.

proteasi tissutali che favoriscono il taglio dell'emoagglutinina nella forma attiva o il pH acido che condiziona l'adesione virale attraverso modificazioni steriche dell'emoagglutinina. La quantità e la distribuzione tissutale di cellule con recettori sialici di adesione per l'emoagglutinina quali  $\alpha$ -2,3 galattosio o  $\alpha$ -2,6 galattosio, la presenza delle proteasi e le diverse condizioni di pH nei parenchimi definiscono sia il tropismo del virus per gli apparati sia la capacità dello stesso di infettare o meno, con diversa gravità, le diverse specie aviarie selvatiche e domestiche. Tutto questo sta alla base del determinismo dello spettro d'ospite e quindi del ruolo epidemiologico delle diverse specie selvatiche nella diffusione o nel mantenimento dell'agente eziologico.

### L'equilibrio evolutivo

Se dalle specie aviarie originano tutti i sottotipi H (H1/H16) ed N (N1/N9), è probabilmente negli uccelli acquatici e in particolare negli Anseriformi – un ordine che comprende anatre, cigni e oche – che il virus ha trovato il serbatoio epidemiologico. La speciazione di tale gruppo è riconducibile filogeneticamente al Miocene in un'epoca compresa tra i 10 e i 7 milioni di anni fa<sup>1</sup>. In questo ordine zoologico il virus ha avuto modo di intraprendere un percorso di evoluzione convergente con il proprio ospite raggiungendo in situazioni naturali una condizione vicina alla stasi evolutiva, stato che nell'ospite anseriforme si esprime attraverso una quasi totale attenuazione della patogenicità e una ridotta frequenza di mutazioni (virus stabili). In tempi successivi i virus influenzali hanno esteso lo spettro d'ospite ad altri gruppi aviari esprimendo normalmente caratteristiche di bassa patogenicità (LPAI) e in rarissimi casi patogenicità elevate (HPAI), come nel caso del virus A/Tern/South Africa/1961, H5N3.

La comparsa di un virus influenzale evolutosi ad alta patogenicità nelle specie aviarie selvatiche deve essere considerato un evento eccezionalmente raro e di breve durata, perché le varianti virali ad alta patogenicità all'interno di sistemi naturali non sono evolutivamente vantaggiose e quindi sono normalmente destinate all'estinzione. Ulteriori frontiere si sono aperte per i virus influenzali di tipo A con la possibilità, spesso mediata dal suino quale *mixing vessel*, di utilizzare come ospiti anche i mammiferi come il cavallo (H7N7, H3N8), il cane (H3N8), i felidi (H5N1) il furetto (H10N4), i viverridi (H5N1), i mammiferi marini (H7N7, H4N5) o l'uomo (H1N1, H2N2, H3N2)<sup>10,14</sup>. In epoca recente, si è potuto constatare come virus aviari presenti nel pollame siano in grado di infettare e a volte di far ammalare direttamente l'uomo (H5N1, H9N2, H7N7, H7N3)<sup>8</sup>.

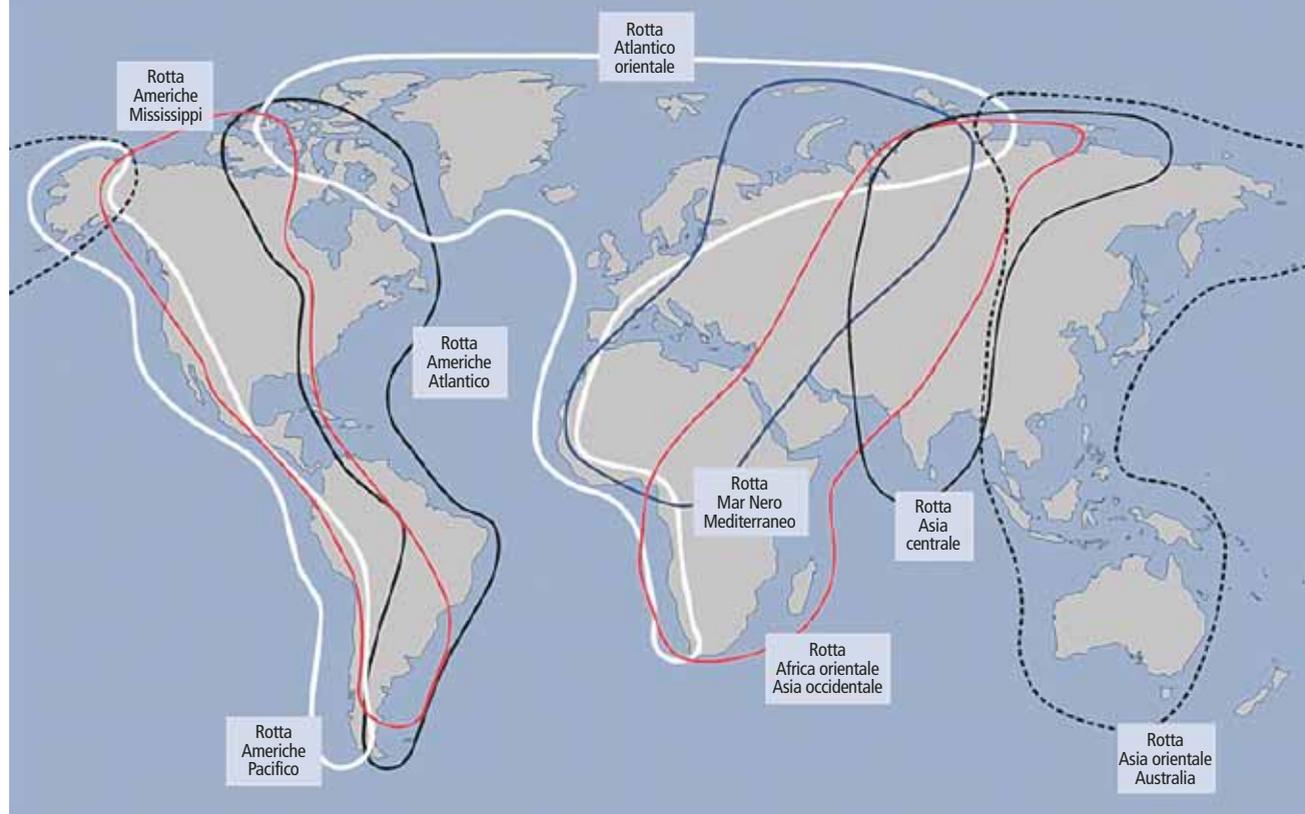
Tale evidenza ha trovato una risposta scientifica nel fatto che sulle cellule ciliate dell'apparato respira-

torio umano esistono glicoproteine di superficie in cui l'acido sialico si trova in posizione  $\alpha$ -2,3, posizione ottimale perché possano essere infettate da virus aviari.

Tra le specie aviarie a vita libera, gli Anseriformi rappresentano il serbatoio dell'agente eziologico, ovvero il gruppo in cui i virus influenzali replicandosi si perpetuano nel tempo. Le caratteristiche etologiche quali l'elevata tendenza all'aggregazione, la possibilità di eseguire migrazioni nonché una stretta interazione con l'ambiente acquatico ne fanno un ospite ideale. La replicazione virale avviene in queste specie principalmente nel tratto intestinale e l'eliminazione va da pochi giorni a 4 settimane. In Europa, l'ordine è rappresentato da circa 13/15.000.000 di individui, distribuiti per classi d'età in un rapporto 1:1 tra giovani e adulti. La *sex ratio* nelle diverse specie è quasi sempre leggermente a favore dei maschi, mentre la popolazione è soggetta a un ricambio annuo del 50% degli individui per compensarne la mortalità. Nel Paleartico europeo le specie che con diversa importanza svolgono il ruolo di serbatoio per i virus influenzali appartengono principalmente alla famiglia *Anatinae*. Le diverse distribuzioni che le singole specie componenti la famiglia presentano sono spesso condizionate sia dalla presenza di habitat idonei sia dalla diversa localizzazione dei quartieri di riproduzione (Nord/Est) e di svernamento (Sud/Ovest). Le anatre selvatiche migrano per diverse necessità biologiche che ne condizionano la sopravvivenza e che sono variabili da specie a specie e da popolazione a popolazione.

Il raggiungimento dei territori avviene attraverso movimenti di migrazione stagionale con movimenti di discesa, alla ricerca di aree a clima mite in tarda estate e autunno (verso le aree meridionali dell'emisfero boreale) e di risalita verso le aree di riproduzione in tardo inverno e inizio primavera (aree settentrionali, post-disgelo). Nel primo caso, dopo una prima parziale migrazione verso le aree in cui avviene la muta delle remiganti, la popolazione riproduttiva migra verso sud accompagnata dai soggetti giovani nati nell'anno, mentre nella migrazione di risalita tutto il contingente è costituito da individui potenzialmente riproduttivi. Tale dato risulta di particolare rilievo alla luce del fatto che è la popolazione giovanile a consentire la ciclicità dell'infezione influenzale, offrendo al calo dell'immunità passiva un nuovo substrato infettabile. La fase di discesa della migrazione è caratterizzata da un flusso più lento rispetto alla più veloce risalita, con soste protratte nei siti idonei. Tra le caratteristiche salienti che si riscontrano nelle specie serbatoio durante questo movimento migratorio, una è rilevante ai fini dell'incremento di circolazione dei virus influenzali. La migrazione di discesa verso Sud/Ovest inizia nel Paleartico subito dopo la stagione riproduttiva e prevede tappe intermedie con una

LE VIE DELLE MIGRAZIONI

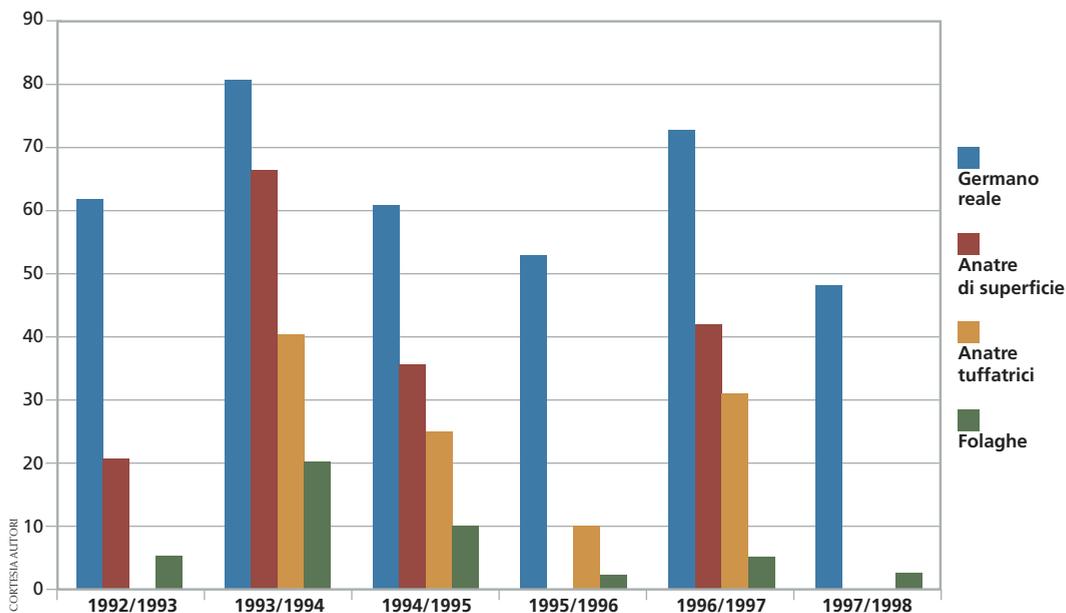


Le principali rotte percorse dagli uccelli migratori in tutto il mondo.

sosta di circa un mese durante la quale le anatre selvatiche adulte sostituiscono contemporaneamente tutte le remiganti, ovvero le penne delle ali impiegate nel volo. In questo periodo gli uccelli non sono in grado di volare e si concentrano in folti gruppi nei grandi laghi centroeuropei in cui si realizza un'aggregazione di individui provenienti da diverse aree di nidificazione, all'interno di un sistema acquatico. In questo contesto anatre con diversi corredi immunitari interagiscono con virus influenzali provenienti da aree diverse. Si viene così ad avere una notevole circolazione virale tra le anatre, che riprenderanno la migrazione portando con sé pochi virus e una elevata prevalenza anticorpale verso l'influenza aviaria. Le popolazioni di anatidi del Paleartico sono in ultimo «parzialmente migratrici» con una componente sedentaria e una migratrice, in quasi tutte le specie, con eccezione della marzaiola e della pesciaiola (*Mergus albellus*) quasi totalmente migratrici, e della casarca, del gobbo rugginoso e dell'anatra marmorizzata, che sono sedentarie <sup>1</sup>. Le vie di migrazione impiegate dagli Anseriformi durante l'autunno nell'attraversamento della Regione Palearctica Occidentale seguono principalmente le vie d'acqua e si orientano con la po-

sizione degli astri. Le principali direttrici di movimento attraversano l'Europa da Nord/Est verso Sud/Ovest. I contingenti con origini più occidentali sorvolano la penisola scandinava e attraversando Gibilterra giungono in Africa. Altre rotte si originano da paesi del Nord/Est dell'Europa e giungendo in centro Europa seguono la costa mediterranea dell'Italia in cui in parte si fermano a svernare, mentre altre proseguono verso l'Africa. Un ulteriore tragitto si origina dall'estremo Nord/Est Europeo (Russia), attraversa i Balcani, e raggiunge le zone umide della costa adriatica in cui in parte sverna e in parte prosegue per il Nord Africa. Tra le rotte più orientali una attraversa il Centro Europa per sfiorare il Mar Nero, sorvolare Romania, Turchia ed entrare in Africa orientale. Eccezione fatta per le marzaiole (*Anas querquedula*) che svernano principalmente in Africa Centro/Occidentale compiendo una migrazione transahariana, tutte le altre specie utilizzano prevalentemente le zone umide del bacino del Mediterraneo come aree di svernamento <sup>12</sup>. L'Italia funge sia da area di svernamento e di riproduzione per alcune specie, sia di solo svernamento per la maggior parte degli anatidi con coinvolgimento migratorio primaverile e autunnale. I

### SIEROPREVALENZE PER VIRUS INFLUENZALI IN UCCELLI ACQUATICI SVERNANTI



La prevalenza del virus in diverse specie dell'oasi di Orbetello varia in funzione della loro nicchia alimentare.

censimenti che vengono effettuati annualmente nei quartieri invernali stimano una consistenza totale della popolazione di anatidi del Palearctico che oscilla tra i 13 e i 15 milioni di individui. In Italia queste aree di sosta sono numerose e variano a seconda delle caratteristiche ecologiche delle specie, è infatti comune per le anatre tuffatrici svernare nei maggiori specchi d'acqua nazionali caratterizzati da acque profonde, mentre le anatre di superficie si concentrano prevalentemente in paludi di acque basse.

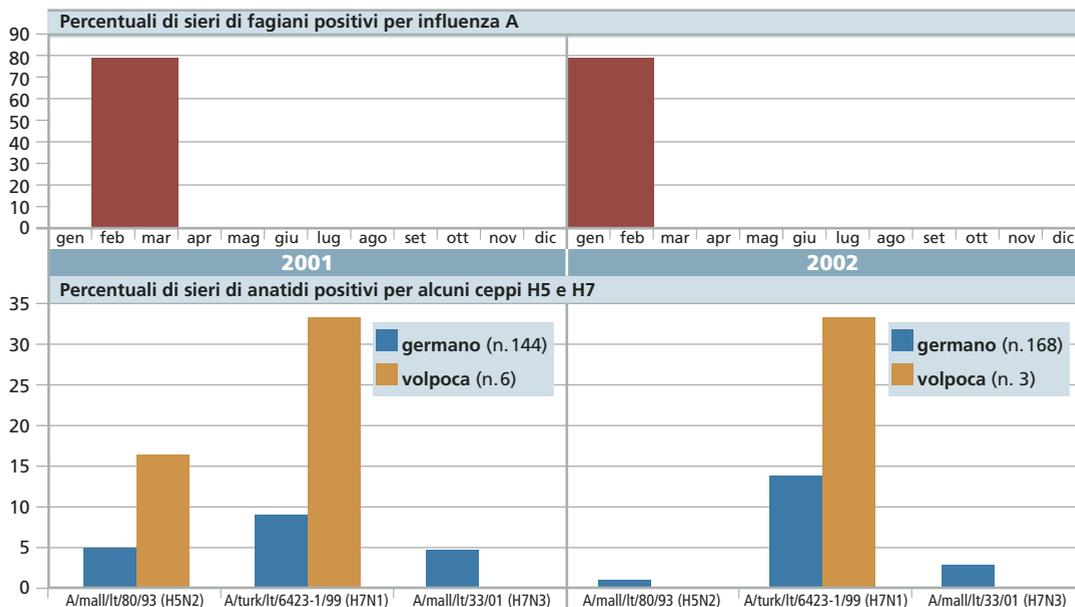
#### Circolazioni diverse

I siti sono spesso aree a elevata produttività, in cui si concentrano numerosissimi individui appartenenti a diverse specie di anatidi che per un periodo condividono questi ambienti con una quantità eterogenea di altre specie ornitiche a loro volta stanziali e migratrici. Si vengono così a costituire aggregazioni omoe eterospecifiche catalizzate dalla presenza di fattori ambientali favorevoli quali principalmente la disponibilità trofica. In questi contesti si creano situazioni particolarmente favorevoli per la possibile trasmissione di virus influenzali sia tra popolazioni allopatriche omospecifiche, sia in gruppi eterospecifici. L'aggregazione autunno-invernale avviene in presenza dei soggetti giovani delle diverse specie, individui caratterizzati da una spiccata sensibilità all'agente eziologico. La circolazione del virus nelle specie serbatoio è condizionata dal fatto che si tratti o meno di sottotipi normalmente presenti nella popolazione. Nel caso in cui vi sia una parziale

immunità del serbatoio, i virus percorrono due vie di perpetuazione. La prima si verifica in Italia tra agosto e ottobre, periodo in cui la popolazione giovanile delle anatre incontra l'agente eziologico nell'ambiente infettandosi e, fungendo da volano di amplificazione, induce un aumento stagionale della pressione infettante del virus nell'ambiente. Nel periodo invernale la presenza dei sottotipi endemici diviene meno evidente, spesso svelabile con difficoltà in una microcircolazione a bassissima pressione infettante in virtù della scarsissima eliminazione virale<sup>7</sup>. Ben diversa è la situazione che si viene a creare in presenza di un sottotipo immunitariamente sconosciuto alla popolazione selvatica. In questo caso l'infezione assume caratteristiche epidemiche e il virus utilizza tutta la popolazione per replicarsi, senza distinzioni di classi di età. Il potenziale aumento della replicazione incontra come unico limite reale la quantità di ospiti recettivi e le loro possibilità di interazione, minime nel periodo riproduttivo e massime nel periodo di svernamento.

Nel periodo invernale l'evidenza virologica della circolazione virale si riduce drasticamente con l'aumentare dell'immunità di popolazione, e la dimostrazione che i virus influenzali circolino all'interno della popolazione è possibile quasi esclusivamente attraverso gli improvvisi innalzamenti del titolo anticorpale che alcuni soggetti catturati ed esaminati più volte manifestano durante lo stesso periodo di svernamento. La qualità dell'acqua in cui le anatre selvatiche vivono, intesa come pH, salini-

## SIEROPREVALENZE PER VIRUS INFLUENZALI NEL 2001 - 2002



Anche se un virus circola in una specie serbatoio, può non riuscire a saltare a un'altra specie sensibile non serbatoio che condivide lo stesso ambiente. Fra i fagiani, specie non serbatoio, il virus influenzale A era molto diffuso (grafico in alto), ma il sottotipo H7N3 era del tutto assente, pur circolando ampiamente fra gli anatici (in basso).

tà e temperatura, può divenire un ulteriore elemento che facilita la persistenza del virus nell'ambiente<sup>13</sup> e la sua assunzione attraverso la filtrazione, come elemento di ricerca alimentare o di abbeverata, espone all'assunzione dell'agente virale.

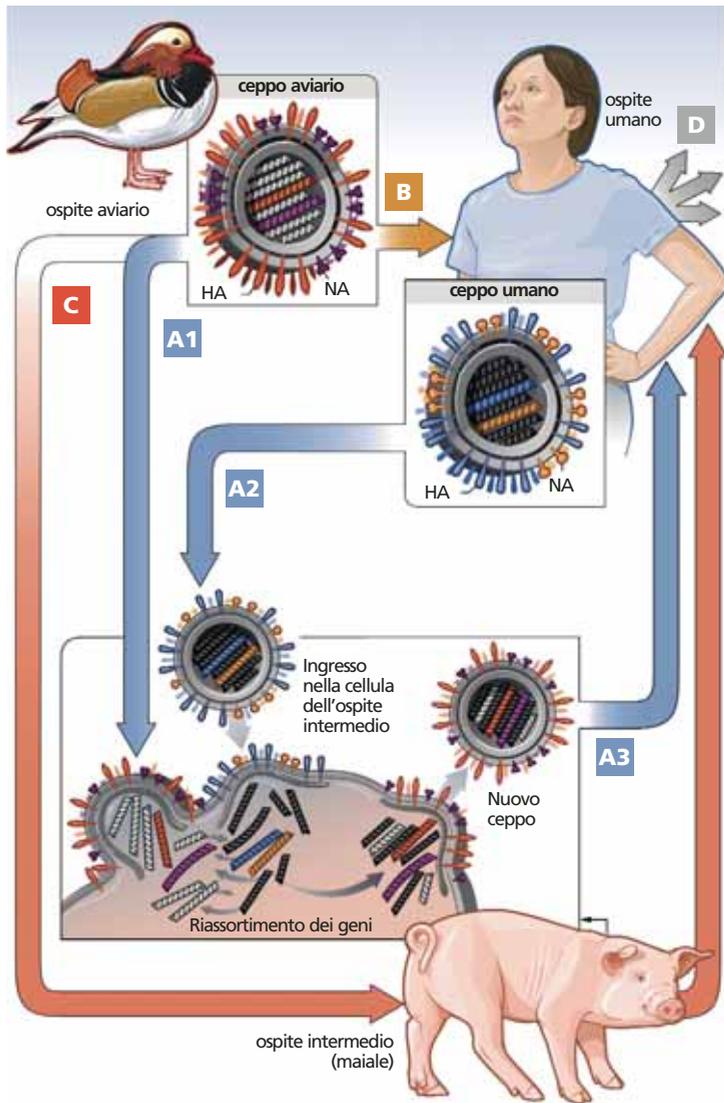
In chiave ecologica la profondità e il ricambio dell'acqua costituiscono due dei principali elementi di interazione tra ospite e agente eziologico. In aree limitate la notevole densità dei soggetti in rapporto all'esiguità delle superfici d'acqua (migrazione di muta, elevata disponibilità trofica locale) aumenta notevolmente la frequenza di contatto tra gli individui, con ulteriore agevolazione della diffusione del virus. Condizioni climatiche particolarmente sfavorevoli nel periodo invernale (ghiaccio) possono contribuire all'accentuazione delle interazioni. L'acqua va inoltre vista non solo come elemento di trasmissione dell'agente virale, ma anche di conservazione temporale dello stesso<sup>13</sup> consentendo nel tempo la trasmissione dell'infezione in assenza di contatto diretto tra gli individui. Viene inoltre a determinarsi un'ulteriore potenzialità di trasmissione, mediante l'abbattimento di barriere etologiche tra specie diverse tramite l'assunzione di acqua d'abbeverata.

Da quanto esposto si può osservare come il limite ecologico di interazione tra specie venga così facilmente superato e come sia facilitata la circolazione del virus sia nelle specie serbatoio sia negli epifenomeni. In realtà la modesta ospite-specificità

dell'influenza trova in quanto detto tutta una serie di opportunità epidemiologiche. L'agente eziologico può trasmettersi attraverso l'acqua a una nutrita gamma di specie aviarie in cui è in grado o meno di dare malattia. In generale molte delle oltre 400 specie ornitiche italiane possono assumere il ruolo di epifenomeno, ovvero specie potenzialmente capaci di ospitare e diffondere il virus per un periodo di tempo in genere limitato ma non in grado, in virtù di limiti biologici, di consentirne il mantenimento in natura nel tempo. Il ruolo ecologico di tali specie nel ciclo epidemiologico dell'influenza aviaria è spesso oggetto di confusione. L'infezione in queste specie assume facilmente caratteristiche epidemiche, elemento che in tempi variabili, a seconda della densità e delle frequenze di interazione individuali e di gruppo, si conclude con l'autoestinzione della circolazione virale.

La possibilità che i virus influenzali aviari vengano trasportati da queste specie durante le migrazioni è legata al verificarsi di particolari condizioni favorevoli, ad esempio la composizione quantitativa degli stormi invernali che alcune specie presentano, la tipologia di migrazione (lungo o corto raggio), o ancora il numero di soste e di conseguenza il tempo necessario per eseguire la migrazione. Concorrono ancora caratteristiche virali tra cui il tempo di incubazione e la patogenicità del virus. In Italia, nel corso di un monitoraggio permanente attivo sull'avi-

**LE TRE VIE DEL SALTO DI SPECIE**



**A-1.** Un'anatra o un altro uccello acquatico trasmette un ceppo aviario di influenza A a un ospite intermedio come un pollo o un maiale

**A-2.** Una persona trasmette un ceppo umano di influenza A allo stesso pollo o maiale (il riassortimento può avvenire anche in una persona coinfettata da due ceppi). Quando il virus aviario e quello umano infettano la stessa cellula, i loro geni si mescolano dando origine a un nuovo ceppo

**A-3.** Il nuovo ceppo può diffondersi dall'ospite intermedio agli umani

**B.** Senza andare incontro a riassortimento, un ceppo aviario può saltare direttamente da un uccello acquatico a un essere umano.

**C.** Senza andare incontro a riassortimento, un ceppo aviario può saltare direttamente da un uccello acquatico a un ospite intermedio e da questo a un essere umano

**D.** Il virus può evolversi ulteriormente per diffondersi da persona a persona e generare la pandemia

fauna selvatica dal 1992 ad oggi, si è potuto osservare come la circolazione dei virus influenzali negli epifenomeni sia di gran lunga ridotta se paragonata a quella dei serbatoi <sup>5,6</sup>.

**Un mondo trasformato**

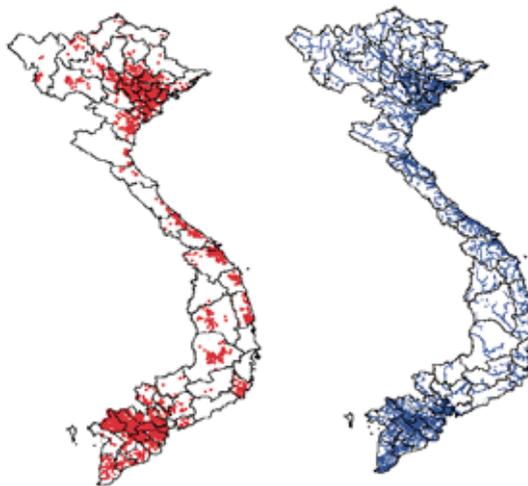
In natura il monitoraggio delle specie epifenomeno evidenzia sovente come queste non dimostrino interazioni con i virus influenzali o lo facciano in maniera discontinua, condizionati dall'esposizione occasionale (predazione) o stagionale (contatto) con le specie serbatoio. L'indagine ha dimostrato come specie caratterizzate da migrazioni nell'Est Europa o in Sud Africa (Caradriformi – *Laridae*, *Sternidae*), specie di possibile interfaccia ecologica tra ambiente selvatico e domestico (Passeriformi di palude), specie di

Galliformi stanziali (fagiano) o migratori (quaglia) caratterizzati da affinità filogenetica con il pollo, Anatidi a svernamento subsahariano (marzaiola) e specie consumatrici terziarie (rapaci diurni e notturni) evidenzino un'interazione con virus influenzali assente o modesta e svelabile solo sierologicamente <sup>6</sup>. Durante la ricerca, ad esempio, è stato possibile osservare come in un'area dove nella popolazione svernante di germano reale circolavano virus del sottotipo A H7N3, non venissero infettati i fagiani che, potenzialmente sensibili all'infezione, ne condividevano l'ambiente a stretto contatto. Una segregazione legata alla biologia delle singole specie è stata evidenziata con lo studio comparativo tra specie simpatiche quali Anatidi e Rallidi (*Fulica atra*) da cui è emerso che specie che utilizzano gli stessi ambienti

possono possedere cicli distinti legati a sottotipi virali diversi. Tra le ulteriori conseguenze che l'infezione degli epifenomeni comporta nell'epidemiologia dell'influenza aviaria, troviamo la minor stabilità del virus con una più facile evoluzione divergente. In natura tali specie sembrano essere usate dal virus occasionalmente per aumentare la propria pressione infettante nell'ambiente, così come per condizionarne alcuni aspetti evolutivi.

Se osservassimo oggi il nostro pianeta con gli occhi di un virus influenzale, vedremmo un mondo profondamente cambiato rispetto a quello che lo ha originato. Biomasse animali e umane convivono in spazi limitati e possiedono dimensioni senza precedenti. Ecologie stravolte artificialmente producono decine di miliardi di nuovi individui all'anno, un substrato ideale per un virus influenzale. Favorito dalla densità e dalla omogeneità genetica delle specie allevate intensivamente<sup>3</sup>, un virus può interagire per tutto l'anno con un substrato continuamente rinnovato dalla rapidità dei cicli di produzione e incontrare sempre un numero elevatissimo di individui recettivi. Se non controllato, un virus influenzale si trova in una sorta di acceleratore evolutivo dove la competizione tra sottopopolazioni virali lo porta a percorrere tutte le strade evolutive possibili<sup>7</sup> inclusa quella verso l'alta patogenicità. In questo contesto emergono con maggior facilità nuovi virus capaci di uscire dalle specie serbatoio e sfruttare contemporaneamente le grandi popolazioni animali quali quella avicola<sup>2</sup>, quella suina e quella umana. Si tratta fondamentalmente di perfetti meccanismi naturali di riequilibrio che usano la pressione selettiva e la quantità di ospiti per trarne la massima opportunità di specie. È il caso di H5N1 che

### FOCOLAI VIETNAMITI DI H5N1



In Vietnam la distribuzione dei focolai di H5N1 (a sinistra) ricalca strettamente quella dei corsi d'acqua (a destra), segnalando il ruolo degli uccelli acquatici nella diffusione del virus.

nel Sud/Est asiatico ha dimostrato abilità autodistruttive uccidendo il proprio serbatoio selvatico ed esibendosi più volte in un salto di specie volto a «colonizzare» la specie umana. L'individuazione delle strategie ecologiche di questa malattia è un elemento determinante per comprenderla e per gestirne correttamente gli esiti che determina.

Mauro Delogu e Maria Alessandra De Marco, Dipartimento di Veterinaria, Università di Bologna. Isabella Donatelli, Dipartimento di Virologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

#### Bibliografia

- Chelini A., 1984. *Le Anatre Selvatiche*, (Editoriale Olimpia, Firenze), 1-383.
- Campitelli L. et al. (2004) Interspecies transmission of a H7N3 influenza virus from wild birds to intensively reared domestic poultry in Italy. *Virology* 323, pp. 24/36.
- Campitelli L. et al. (2001). H3N2 Influenza Viruses from domestic chickens in Italy: an increasing role of chickens in the ecology of influenza? *J. Gen. Virol.* 83: 413-420
- Dale H.C. e Moore J., 1997. *Host Parasite evolution: general principles and avian model*, Oxford University Press, Oxford.
- De Marco M.A. et al. (2003) Long-term monitoring for avian influenza viruses in wild bird species in Italy. *Veterinary Research Communications* 27, Supplement 1, pp.107-114.
- De Marco M. A. et al. (2003). Circulation of influenza viruses in wild waterfowl wintering in Italy during the 1993-1999 period: evidence of virus shedding and seroconversion in wild ducks. *Avian Diseases* 47 : 861- 866.
- Domingo E. et al, Population Dynamics in the evolution of the RNA virus. Proceedings of the VII Int. Simp. of Coronavirus and Arterivirus. Segovia, Spain 10/15 May 1997.
- Donatelli I. et al. (2003). Influenza viruses: structure and interspecies transmission mechanism. *Veterinary Research Communications* 27, Supplement 1, pp. 115-122.
- Guan, Y. et al. (2002). H5N1 influenza viruses isolated from geese in Southeastern China: evidence for genetic reassortment and interspecies transmission to ducks. *Virology*, 292, 16-23.
- Horimoto T. and Kawaoka Y. (2001). Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (1), 129-149.
- Moja A., Holmes C.E., Gonzalez Candela F. (2004). The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews*, vol.2, 1-11.
- Scott D.A. and Rose P.M., 1996. *Atlas of Anatidae populations in Africa and Western Eurasia*. Wetlands International Publication No. 41, 1-336.
- Stallknecht, D.E. et al. (1990). Persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Diseases*, 34, 406-411.
- Webster, R.G. et al. (1992). Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiological Reviews*, 56 (1), 152-179.