

Alma Mater Studiorum
Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN EPIDEMIOLOGIA E
CONTROLLO DELLE ZONOSI – XXI CICLO**
Coordinatore: Prof. Giovanni Poglayen

Settore scientifico disciplinare: Vet/05

**Sorveglianza dell'influenza aviare:
studio di un sistema di rilevazione precoce
della circolazione virale
in popolazioni di volatili selvatici**

**Tesi di Dottorato di:
Dott.ssa Elisa Armaroli**

**Docente guida:
Prof. ssa Raffaella Baldelli**

**Coordinatore:
Prof. Giovanni Poglayen**

Esame finale anno 2010

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	2
INTRODUZIONE	3
PARTE I – LA SORVEGLIANZA IN MEDICINA VETERINARIA	5
1.1 SORVEGLIANZA. PRINCIPI E METODI	6
1.2 SORVEGLIANZA IN MEDICINA VETERINARIA	9
1.2.1 Obiettivi della sorveglianza	10
1.2.2 Tipi di sorveglianza	11
1.2.3 Punti critici di un sistema di sorveglianza	14
1.2.4 Meccanismi di sorveglianza	16
1.3 CAMPIONAMENTO. BASI CONCETTUALI	18
1.3.1 Metodi di campionamento non probabilistico	19
1.3.2 Metodi di campionamento probabilistico	19
1.3.3 Stima della dimensione del campione	21
1.3.4 Stima della presenza di malattia	23
1.3.5 Calcolo degli intervalli di confidenza	24
1.4 SORVEGLIANZA E MONITORAGGIO DELLE MALATTIE DELLA FAUNA SELVATICA	26
1.4.1 Monitoraggio degli eventi di mortalità nella fauna selvatica	31
1.4.2 Campionamento e malattie della fauna selvatica: limiti e peculiarità	33
PARTE II – INFLUENZA AVIARE. ECOLOGIA ED EVOLUZIONE	37
2.1 INFLUENZA AVIARE. ECOLOGIA ED EVOLUZIONE	38
2.1.1 Eziologia	39
2.1.2 Il virus influenzale nei mammiferi	45
2.1.3 Il ruolo del suino come “mixing vessel”	47
2.1.4 Ecologia del virus negli uccelli domestici d’allevamento	47
2.1.5 I virus influenzali nell’uomo	48
2.1.6 Ecologia del virus influenzale negli uccelli acquatici	51
2.1.7 Altri uccelli selvatici	55
2.1.8 Mantenimento del virus nelle popolazioni selvatiche	55
2.2 IL VIRUS INFLUENZALE AD ALTA PATOGENICITÀ H5N1	57
2.2.1 La diffusione mondiale del virus	60
2.2.2 L’origine genetica del virus	61

2.2.3	Il rischio pandemico	63
2.2.4	Altri virus potenziali responsabili di pandemia	67
PARTE III – IL RUOLO EPIDEMIOLOGICO DEI VOLATILI SELVATICI		69
3.1 IL RUOLO EPIDEMIOLOGICO DEGLI UCCELLI MIGRATORI		70
3.1.1	Il cambiamento di ecologia del virus	70
3.1.2	Verso un nuovo rapporto tra uccelli migratori e HPAI virus	73
3.1.3	Patogenesi dell'infezione da H5N1 negli uccelli selvatici	74
3.1.4	Stabilità ambientale dell'H5N1	76
3.1.5	Ecologia delle specie di anatidi a rischio di esposizione all'H5N1	77
3.2 MIGRAZIONI SELVATICI E ALTRI SPOSTAMENTI DEGLI UCCELLI		80
3.2.1	Metodi di studio dei movimenti degli uccelli	80
3.2.2	Le migrazioni stagionali	81
3.2.3	Rotte migratorie principali	83
3.2.4	Aree interessate alla migrazione	85
3.2.5	Movimenti diversi dalle migrazioni stagionali	88
3.2.6	Qualità delle informazioni sulle migrazioni	88
3.3 FONTE DELLE INFORMAZIONI SU CONSISTENZA E DISTRIBUZIONE DELLE POPOLAZIONI DI VOLATILI SELVATICI		90
3.3.1	I censimenti	90
3.3.2	Gli inanellamenti	93
PARTE IV – LA SORVEGLIANZA DELL'INFLUENZA AVIARE NEI VOLATILI SELVATICI		96
4.1 LA SORVEGLIANZA NEL MONDO		97
4.1.1	Verso una sorveglianza globale	97
4.1.2	Progetti internazionali in corso	98
4.1.3	Early warning, early detection	104
4.1.4	La sorveglianza in Europa	110
4.1.5	Il piano di monitoraggio nazionale	114
	4.1.5.1 <i>Schema e attuazione della sorveglianza</i>	116
	4.1.5.2 <i>Raccolta e analisi dei campioni</i>	118
PARTE V – STUDIO SPERIMENTALE		121
PREMESSA		122
5.1 MATERIALI E METODI		
5.1.1	Sorveglianza dell'influenza aviare nelle popolazioni selvatiche.	

Analisi dei risultati	123
5.1.1.1 Sorveglianza in Europa. Anni 2004-2007	123
5.1.1.2 Sorveglianza in Italia. Anni 2006-2008	130
5.1.2 Studio sui tassi di rilevamento dell'infezione	137
5.1.3 Modello matematico	140
5.1.3.1 I modelli matematici applicati all'epidemiologia delle malattie della fauna selvatica	140
5.1.3.2 Dinamica di infezione	142
5.1.3.3 Allestimento del modello matematico	150
5.2 RISULTATI	155
5.2.1 Studio su base probabilistica	155
5.2.2 Modello matematico	160
5.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI	181
5.4 QUALE SORVEGLIANZA PER L'INFLUENZA AVIARE NELL'AVIFAUNA SELVATICA?	195
PARTE VI – CONCLUSIONI	
CONCLUSIONI	204
PARTE VII – APPENDICE	206
APPENDICE I	207
APPENDICE II	210
PARTE VIII - BIBLIOGRAFIA	
BIBLIOGRAFIA	213

RIASSUNTO

L'emergenza rappresentata dall'infezione da virus dell'influenza aviaria ad alta patogenicità (HPAI), sottotipo H5N1, ha catalizzato l'attenzione della comunità scientifica mondiale, imponendo la tempestiva predisposizione di sistemi di controllo efficaci per individuare precocemente, e in via prioritaria, la circolazione di virus influenzali a bassa patogenicità (LPAI) nelle popolazioni di volatili selvatici allo scopo di prevenire epidemie da virus ad alta patogenicità (HPAI) nelle popolazioni di volatili domestici, con possibile trasmissione all'uomo. Il progetto nasce con l'intento di fornire, attraverso un'analisi preliminare dei dati derivanti dalla sorveglianza in Italia e in Europa, uno studio su basi statistiche dei tassi giornalieri di rilevamento dell'infezione e l'allestimento di modelli matematici di simulazione, una valutazione oggettiva dell'efficacia dei sistemi di sorveglianza dell'influenza aviaria nelle popolazioni di volatili selvatici, e di indicare linee di indirizzo a supporto del processo di pianificazione delle attività di campionamento. I risultati ottenuti dall'elaborazione statistica permettono di quantificare lo sforzo campionario in termini di tempo e dimensione del campione, e simulando diversi scenari epidemiologici individuano nella sorveglianza attiva il mezzo più adatto al monitoraggio dell'infezione da virus LPAI, endemica negli uccelli acquatici, e nella sorveglianza passiva l'unico strumento realmente efficiente nell'individuare in tempi relativamente brevi la circolazione del virus HPAI H5N1 in popolazioni selvatiche.

Considerando che informazioni rilevanti sono tuttora insufficienti alla definizione di programmi di sorveglianza per HPAI H5N1, e che esistono effettivi limiti logistici e di finanziamento, un approccio che faccia ricorso a strumenti statistici di valutazione e previsione dell'efficacia delle attività di monitoraggio intraprese si rivela di primaria importanza per indirizzare il processo decisionale ed utilizzare al meglio le risorse disponibili.

ABSTRACT

The emergency of infection by highly pathogenic avian influenza virus (HPAI) subtype H5N1 has focused the attention of the world scientific community, requiring the prompt provision of effective control systems for early detection of the circulation of low pathogenic influenza H5 viruses (LPAI) in populations of wild birds to prevent outbreaks of highly pathogenic (HPAI) in populations of domestic birds with possible transmission to humans. The project stems from the aim to provide, through a preliminary analysis of data obtained from surveillance in Italy and Europe, a preliminary study about the virus detection rates and the development of mathematical models, an objective assessment of the effectiveness of avian influenza surveillance systems in wild bird populations, and to point out guidelines to support the planning process of the sampling activities. The results obtained from the statistical processing quantify the sampling effort in terms of time and sample size required, and simulating different epidemiological scenarios identify active surveillance as the most suitable for endemic LPAI infection monitoring in wild waterfowl, and passive surveillance as the only really effective tool in early detecting HPAI H5N1 circulation in wild populations. Given the lack of relevant information on H5N1 epidemiology, and the actual financial and logistic constraints, an approach that makes use of statistical tools to evaluate and predict monitoring activities effectiveness proves to be of primary importance to direct decision-making and make the best use of available resources.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni un crescente numero di infezioni hanno coinvolto l'uomo, la fauna selvatica e gli animali domestici, e malattie quali il morbo della mucca pazza, la malattia di Lyme, il vaiolo delle scimmie, il virus Nipah, o la SARS sono diventati termini di uso comune. Più recentemente, l'emergenza rappresentata dall'infezione da virus dell'influenza aviaria ad alta patogenicità (HPAI), sottotipo H5N1, ha catalizzato l'attenzione della comunità scientifica mondiale, per il rischio potenziale che tale virus potesse essere la causa della prossima pandemia influenzale umana (de Jong et al., 1997). Mentre le conoscenze della comunità scientifica la classificavano come un'infezione primariamente del pollame, dirigendo prevenzione e misure di controllo a livello di produzione agricola e pratiche di allevamento, è progressivamente cresciuto l'interesse per il ruolo che gli uccelli selvatici possono giocare nell'albergare, mantenere e trasmettere il virus influenzale a livello internazionale o intercontinentale.

Si è rivelato pertanto indispensabile predisporre sistemi di controllo maggiormente efficaci per individuare precocemente, e in via prioritaria, la circolazione di virus influenzali tipo A, sottotipi H5 ed H7 a bassa patogenicità (LPAI), nelle popolazioni di volatili selvatici soprattutto in zone che si sono dimostrate a elevato rischio di infezione. Ciò al fine di attivare adeguate misure per prevenire epidemie da virus ad alta patogenicità (HPAI) nelle popolazioni di volatili domestici, con possibile trasmissione all'uomo.

L'obiettivo più importante dei programmi di sorveglianza dell'HPAI H5N1 nell'avifauna selvatica è quindi l'identificazione precoce della circolazione virale, generalmente da una specie o da un gruppo di specie che rappresentano un potenziale serbatoio naturale del virus. Nel caso di HPAI H5N1 non è ancora stato identificato o confermato un serbatoio selvatico, e questo limita il classico approccio di campionamento secondo una distribuzione binomiale all'interno della popolazione infetta.

Considerando che informazioni rilevanti sono tuttora insufficienti alla definizione di programmi di sorveglianza per HPAI H5N1, e che esistono effettivi limiti logistici e di finanziamento, un approccio che faccia ricorso a strumenti statistici di valutazione e previsione dell'efficacia delle attività di monitoraggio intraprese si rivela di primaria importanza per indirizzare il processo decisionale ed utilizzare al meglio le risorse disponibili.

Il presente progetto nasce proprio dall'esigenza di valutare su basi scientificamente valide l'efficacia e il potenziale sviluppo delle metodiche di campionamento applicate al monitoraggio dei virus influenzali nelle popolazioni di volatili selvatici. Il lavoro, sviluppato presso l'Unità Operativa Veterinaria dell'ex-Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica (ora Istituto per la Protezione e per la Ricerca Ambientale, ISPRA), si propone di individuare i fattori in grado di influenzare l'efficacia dei sistemi di sorveglianza, valutare in termini quantitativi lo sforzo campionario richiesto per la rilevazione precoce della circolazione virale nelle popolazioni ospiti, e ricavare delle informazioni utili a supportare il processo decisionale di pianificazione e coordinamento delle attività di monitoraggio a livello nazionale ed europeo.

PARTE I
LA SORVEGLIANZA IN MEDICINA VETERINARIA

1.1 **SORVEGLIANZA. PRINCIPI E METODI**

Sorvegliare, in Sanità Pubblica, significa raccogliere informazioni mirate relative ad eventi ben definiti che possono essere modificati da un preciso intervento. Secondo la definizione classica, 'la sorveglianza è la sistematica raccolta, archiviazione, analisi e interpretazione di dati, seguita da una diffusione delle informazioni a tutte le persone che le hanno fornite e a coloro che devono decidere di intraprendere eventuali interventi'.

La sistematicità nella raccolta dei dati e l'accuratezza nella loro interpretazione sono indispensabili per ottenere informazioni utili ad impostare un intervento efficace, in accordo al principio 'l'informazione per l'azione'.

In generale, la sorveglianza è volta a dimostrare l'assenza di malattia o infezione, dei fattori che determinano la comparsa o la diffusione di una malattia o infezione, oltre ad individuare il più presto possibile le malattie esotiche o emergenti. Il tipo di sorveglianza applicato dipende dalle informazioni che si desidera ottenere necessarie per sostenere il processo decisionale.

La sorveglianza è una componente essenziale della sanità animale, necessaria ad identificare le malattie, monitorarne l'evoluzione, controllare il decorso delle malattie endemiche ed esotiche, supportare la qualifica di indennità da specifiche infezioni, fornire dati a sostegno del processo di analisi dei rischi, con finalità di tutela della salute degli animali e della sanità pubblica, e di indirizzo nella pianificazione di misure sanitarie. I dati ottenuti con l'attività di sorveglianza devono soddisfare requisiti di qualità per supportare un'accurata analisi dei rischi e fornire informazioni utili al commercio internazionale ed alle decisioni a livello nazionale.

In una visione molto schematica, possiamo immaginare che le attività di sorveglianza includano il trasferimento di dati provenienti dal sistema sanitario ad un centro di lettura (indicato come l'Autorità Sanitaria del livello di competenza) dove vengono trasformati in informazioni e da qui, poi, le decisioni prese, ritornano

al servizio sanitario sotto forma di azioni da intraprendere. Una buona sorveglianza epidemiologica non garantisce che le decisioni prese siano sempre corrette ma, almeno, fornisce la base razionale delle decisioni e sicuramente limita le possibilità di errori grossolani.

Le attività di sorveglianza possono avere diversi obiettivi, quali:

- quantificare e determinare l'andamento temporale di alcune malattie, per sostenere la pianificazione sanitaria e per valutare la necessità di interventi preventivi o l'efficacia di interventi già intrapresi (ad esempio, una campagna di vaccinazione);
- verificare la 'normale' incidenza di una specifica malattia per determinare eventuali soglie epidemiche;
- valutare la distribuzione geografica dei casi per identificare raggruppamenti spaziali che indichino una comune fonte di esposizione all'agente eziologico;
- valutare la ciclicità stagionale e la periodicità di alcune malattie per prevedere l'avvento di periodi di elevata incidenza.

Se il sistema è rivolto alla rilevazione di casi di una specifica malattia è opportuno standardizzare la definizione di caso, cioè fornire i criteri per i quali la malattia osservata viene riconosciuta eleggibile per essere notificata. La necessità di definire le caratteristiche di un caso di una specifica malattia è un'esigenza prettamente epidemiologica e serve ad assicurare un'uniformità relativamente alla rilevazione nel tempo e ai diversi operatori. Per svolgere tale funzione la definizione deve essere chiara, semplice, stabile e sperimentata sul campo. Quindi la definizione di caso agisce come un filtro sulle rilevazioni, in quanto permette la registrazione di alcuni eventi (che rispondono ai criteri definiti) ma non di altri, e influenza, così, la sensibilità e la specificità del sistema di sorveglianza.

Anche i tempi sono importanti e variano con il tipo di sorveglianza. Ad esempio, è evidente che raccogliere casistiche nazionali a scadenza annuale è idoneo a descrivere andamenti temporali in base ai quali definire le linee di politica sanitaria a breve o medio termine mentre, se i dati servono a monitorare l'insorgenza di

focolai epidemici ed il loro controllo, allora il flusso delle informazioni deve essere molto più tempestivo.



Fig. 1 - Azioni necessarie a sviluppare e mantenere un sistema di sorveglianza.

Fonte: modificato da Thacker e Stroup, 1998.

1.2 **SORVEGLIANZA IN MEDICINA VETERINARIA**

Una parte essenziale del controllo delle malattie è la capacità di documentare il verificarsi della malattia con lo scopo di sviluppare strategie di controllo ed eradicazione efficaci; questa è la sorveglianza. Il concetto di sorveglianza non è nuovo: la Santa Inquisizione a seguito dello scatenarsi dell'epidemia di peste bovina in Gran Bretagna nel 18esimo secolo raccomandò la pronta notifica dei casi di malattia (Spinage, 2003), come in Francia nel 19esimo secolo il *Conseil de Salubrité* ordinò alle autorità di segnalare immediatamente i focolai di afta epizootica (Thrusfield, 2005). La sorveglianza delle malattie non denunciabili si è sviluppata in Gran Bretagna nel 20esimo secolo (MAFF, 1965), e l'interesse internazionale per la sorveglianza aumentò con l'istituzione dell'Office International des Epizooties (OIE) nel 1924.

La sorveglianza in origine è stata applicata agli individui, in primo luogo al contatto con gravi malattie contagiose, per il cui controllo si sorvegliava l'insorgenza dei primi segni di malattia. Il termine sorveglianza deriva dal francese “*surveiller*”, “guardare una persona”, e si è evoluto fino al significato attuale in Inghilterra nel corso del 19° secolo. Alcune definizioni descrivono la sorveglianza in termini di monitoraggio, ed alcune autorità tendono ad utilizzare i termini come sinonimi interscambiabili (Acheson *et al.*, 1976). In ogni modo, attualmente c'è il pieno accordo sul fatto che, benché siano strettamente interdipendenti, i due termini abbiano significati distinti e separati.

Il monitoraggio è la raccolta routinaria di informazioni su una malattia, sulla produttività e su altre caratteristiche potenzialmente in relazione ad esse in una popolazione. Per esempio, in Gran Bretagna gli isolamenti di *Mycoplasma spp* da campioni di ruminanti conferiti ai laboratori diagnostici regionali hanno documentato regolarmente l'andamento dell'infezione da *M. bovis* nell'arco di 10 anni, dal 1990 al 2000, ed hanno permesso la prima identificazione di *M. canis* (Ayling *et al.*, 2004).

La sorveglianza, viceversa, è una forma di registrazione dei dati più ampia e complessa del monitoraggio, e si compone di tre elementi:

1. raccolta, registrazione ed analisi dei dati;
2. diffusione delle informazioni alle parti interessate;
3. azioni per il controllo della malattia.

Può essere paragonata ad una cellula nervosa, con una branca afferente che riceve i dati, un corpo cellulare che li analizza, ed una branca efferente che mette in opera le azioni appropriate (Thacker e Bikhead, 2002). Il *Centre for Disease Control and Prevention* (CDC, US) definisce la sorveglianza 'le sistematiche e continuative raccolta, analisi ed interpretazione di specifici dati essenziali alla pianificazione, implementazione e valutazione di azioni pubbliche di controllo, strettamente integrate con la tempestiva diffusione di queste informazioni a tutti coloro che ne necessitano'.

Mentre l'OIE la definisce come 'la continua indagine di una data popolazione atta a verificare la presenza di una malattia con finalità di controllo, indagine che può prevedere il sottoporre ad esame parte della popolazione'.

1.2.1 Obiettivi della sorveglianza

Lo scopo principale della sorveglianza veterinaria segue le finalità generali della medicina veterinaria, ed in particolare il mantenimento di standard di salute e benessere animale, la difesa della salute pubblica (attraverso il controllo delle zoonosi e delle malattie da alimenti di origine animale). Possono essere identificati alcuni obiettivi specifici:

- rapida segnalazione dei focolai di malattia;
- precoce identificazione dell'andamento della malattia (endemico o non endemico);
- definizione dello stato sanitario di una popolazione;
- definizione delle priorità nel controllo e nella prevenzione della malattia;

- identificazione delle nuove malattie emergenti;
- valutazione dei programmi di controllo;
- fornire le informazioni necessarie alla pianificazione e all'attuazione della ricerca;
- conferma dell'assenza di una malattia specifica.

1.2.2 *Tipi di sorveglianza*

Si possono distinguere diversi tipi di sorveglianza sulla base della funzione e del metodo:

- *Sorveglianza di malattia*

La sorveglianza di una malattia si propone lo studio dell'occorrenza e della diffusione di malattie oggetto di piani di controllo. Così, nel corso di focolai di malattia, devono essere individuate, isolate e rimosse le fonti di infezione. Si può definire come la continuativa attenzione alla distribuzione e all'andamento dell'incidenza della malattia attraverso la sistematica raccolta, registrazione ed analisi dei dati di mortalità e morbilità, e di altri parametri importanti nello descrivere la natura e la diffusione dell'evento patogeno.

- *Sorveglianza epidemiologica*

La sorveglianza epidemiologica può definirsi come la continua e sistematica raccolta, analisi ed interpretazione di dati sanitari (spesso definiti allo scopo di individuare l'insorgenza di specifiche malattie) volte a permettere agli epidemiologi di seguire nel tempo e nello spazio l'andamento dello stato sanitario e di fattori di rischio associati alla malattia in una data popolazione, con lo scopo di fornire le informazioni necessarie alla pianificazione, all'implementazione e alla valutazione di misure di controllo della malattia (Toma et al., 1999).

- *Sorveglianza delle sentinelle*

La sorveglianza può includere, parlando di animali domestici, l'intero patrimonio zootecnico nazionale, per esempio nel piano di controllo della tubercolosi bovina. In alternativa, si può procedere alla selezione di pochi allevamenti, macelli,

ambulatori veterinari o laboratori; questi sono quindi definiti come “unità sentinella”, poiché hanno il compito di controllare la potenziale comparsa della malattia. Ancora, la sorveglianza può essere focalizzata su una specie serbatoio dell’infezione, o su altre specie anch’esse recettive all’agente patogeno all’interno della popolazione principale di riferimento. Ad esempio, gli uccelli selvatici possono essere utilizzati come sentinella per l’infezione da virus dell’encefalite di St. Louis, fornendo informazioni sulla circolazione precoce del virus quand’esso ha tassi d’infezione troppo bassi per costituire un rischio per l’uomo. Ancora, la sorveglianza dell’encefalite equina orientale (trasmessa da artropodi) si compone di un regolare monitoraggio sierologico di batterie di polli e fagiani stabulati all’aperto (gli uccelli sono serbatoio della malattia), associato ai risultati di colture virologiche da zanzare catturate, ed alla sorveglianza veterinaria della malattia clinica nei cavalli (Thacker e Birkhead, 2002). Si basa su un approccio simile la sorveglianza del virus West Nile che coinvolge uomini, cavalli, cani, gatti e uccelli selvatici, i vettori artropodi, ed polli unità sentinella (USGS, 2004). Così il termine “sentinella” può essere utilizzato per indicare l’unità specifica di osservazione o una specie animale.

- *Sorveglianza passiva e sorveglianza attiva*

La sorveglianza passiva è stata definita come l’esame dei soli casi clinici di malattia; la sorveglianza attiva al contrario comprende il campionamento (incluso l’esame post-mortem) di animali della popolazione clinicamente sani, e si rivela importante nel controllo di malattie nelle quali predominano i casi di animali sub-cinici o portatori (Blood e Studdert, 2002). Una seconda definizione di sorveglianza passiva, la più usata in medicina veterinaria, la descrive come il monitoraggio continuo dello stato di malattia della popolazione investigata, utilizzando dati raccolti in attività di routine per produrre risultati che possano indirizzare le scelte politiche (Scudamore, 2000). Esempi includono le relazioni dei laboratori di diagnosi, i riscontri dell’ispezione routinaria di carni al macello, la notifica stabilita per legge di malattie denunciabili. La sorveglianza passiva si rivela di primaria importanza nel

caso in cui riesca a tradurre i suoi risultati in azioni concrete di controllo. La sorveglianza attiva coinvolge lo sforzo istituzionale dei servizi veterinari per raccogliere informazioni su una specifica malattia. Sia la sorveglianza attiva che quella passiva hanno pregi e difetti (Meah e Lewis, 2000). La sorveglianza passiva utilizza dati che spesso sono biased (ad esempio, dati che derivano dal conferimento volontario di campioni ai laboratori diagnostici), frequentemente mancando il termine al denominatore (dimensioni popolazione indagata?), così da non poter fornire delle stime delle misure di frequenza della malattia. Al contrario la sorveglianza attiva, se basata su piani ben disegnati, permette la stima di tali indicatori.. La sorveglianza attiva spesso può sottostimare la frequenza di una malattia. Malgrado queste considerazioni, la sorveglianza passiva rappresenta comunque il primo stadio nell'identificazione di malattie nuove ed emergenti, sulle quali non si può focalizzare inizialmente la sorveglianza attiva, poiché il bersaglio non è ancora stato identificato (ad esempio: l'encefalomielite spongiforme bovina o la sindrome respiratoria e riproduttiva del suino). Inoltre, la sorveglianza passiva, presupponendo il conferimento di campioni ai laboratori ed il ritorno delle informazioni ad allevatori e veterinari, aiuta a stabilire rapporti di collaborazione che facilitano lo sviluppo di una rete 'intelligente' di tutela della salute animale. Infine, la sorveglianza passiva richiede costi moderati rispetto alla sorveglianza attiva.

Detto questo, programmi di sorveglianza sia attiva che passiva sono componenti essenziali dei sistemi di sorveglianza nazionali.

- *Sorveglianza mirata*

Il termine 'passivo' ha il grosso svantaggio di non essere in grado di descrivere adeguatamente le funzioni proprie della sorveglianza. Inoltre, il termine può dare l'impressione di essere 'non scientifico', dipendente dal caso, e non implicare l'intraprendere un'azione. Parlando invece di sorveglianza attiva, essa non presuppone attività aggiuntive nel caso, ad esempio, di indagini svolte nel corso di focolai epidemici. Emerge quindi la necessità di rivedere il vocabolario relativo alla

sorveglianza per sostituire i termini ‘passiva’ e ‘attiva’.

La sorveglianza mirata raccoglie informazioni specifiche riguardo una certa malattia così da poter misurare il suo livello nella popolazione e monitorarne l’assenza. Spesso è pianificata applicando specifiche teorie campionarie su base statistica, ed è normalmente focalizzata su popolazioni ad alto rischio di contagio, con il fine di aumentare l’efficacia di identificazione.

La sorveglianza continua (globale) mantiene un monitoraggio continuo su malattie endemiche. Fornisce informazioni sulla situazione epidemiologica riconoscendo precocemente cambiamenti inattesi. Tale tipo di sorveglianza, evidenziando un anomalo aumento della frequenza degli eventi morbosi, permette di attivare indagini specifiche per monitorare l’insorgenza di malattie emergenti o riemergenti. Si tratta in questo caso di sorveglianza sindromica (dal greco syn e dromos: l’insieme dei segni associati ad una malattia).

1.2.3 Punti critici di un sistema di sorveglianza

I punti critici di un sistema di sorveglianza sono la natura dei dati utilizzati, la possibilità di cooperazione a diversi livelli tra gli operatori coinvolti, i costi.

Alcuni paesi, soprattutto fra quelli più sviluppati, possono disporre di infrastrutture veterinarie che facilitano la potenziale o concreta necessità di raccolta di dati. I paesi in via di sviluppo al contrario incontrano grosse difficoltà. Parallelamente, alcune organizzazioni nazionali e internazionali registrano e immagazzinano con regolarità dati in database e sistemi informativi ai quali far riferimento nel corso di attività di sorveglianza o in occasione di studi epidemiologici.

I servizi veterinari governativi si occupano del controllo di malattie rilevanti ad un livello nazionale, ed in particolare di malattie infettive denunciabili, e spesso dispongono di laboratori diagnostici di referenza. I dati raccolti ed elaborati da organizzazioni veterinarie nazionali sono usualmente disponibili sotto forma di reports periodici. L’Office International des Epizooties (OIE) pubblica un bollettino internazionale sulle malattie animali, che ne descrive la situazione epidemiologica

basandosi sulle segnalazioni regolari fornite dai paesi membri.

Un'altra fonte di dati epidemiologici si rivelano essere le strutture veterinarie private, che hanno contatto sia con animali da reddito che con animali da compagnia. I veterinari che si occupano di grossi animali forniscono tendenzialmente la maggioranza delle informazioni sanitarie riferite ai bovini da latte e da carne, seguono i suini e gli ovi-caprini. I proprietari di piccoli animali frequentano gli ambulatori veterinari privati, che diventano una fonte importante di dati sanitari riferiti a cani e gatti, pur falsati dai vari fattori che condizionano i proprietari nel condurre il proprio animale domestico dal veterinario (primo fra tutti le condizioni economiche del proprietario stesso).

Viceversa, gli animali da reddito con patologie lievi o al contrario molto gravi non vengono normalmente sottoposti alle cure veterinarie, così da dar luogo a sottostime di certe patologie.

Un altro inconveniente legato ai dati forniti dai liberi professionisti è la totale assenza di organizzazione delle informazioni riportate, la cui raccolta ed elaborazione può risultare spesso difficoltosa. Stessa osservazione può essere portata riguardo ai dati sanitari raccolti di routine attraverso a registrazione automatica di informazioni sanitarie e fisiologiche degli animali da reddito con l'uso di software dedicati. I ricercatori hanno scarso controllo sulla raccolta di questo tipo di dati, la cui analisi può dar luogo ad errori di valutazione.

I veterinari ispettori presso i macelli possono raccogliere una grande mole di informazioni sulle lesioni patologiche riscontrabili nella carne destinata al consumo. Normalmente le patologie segnalate sono subcliniche, poiché solo gli animali sani vengono macellati, e quelle di più frequente rilievo sono le parassitosi gastro-intestinali e le lesioni epatiche. Essendo l'ispezione sanitaria post-mortem finalizzata alla tutela della salute del consumatore finale, essa è finalizzata all'identificazione di qualsiasi anomalia che renda la carne non adatta al consumo e molto spesso si traduce in un esame macroscopico. Parallelamente alla finalità principale di tutela della salute pubblica, l'ispezione al macello si propone anche di

registrare ed archiviare le lesioni patologiche riscontrate, per utilizzare queste informazioni a scopo epidemiologico, per esempio per associare l'insorgenza di malattie nell'uomo a infezioni degli animali (Thrusfield, 2005). L'ispezione presso i macelli si può rivelare indispensabile per la sorveglianza di malattie per le quali altri metodi diagnostici si sono rivelati inefficaci. Infine, la tracciabilità dei capi abbattuti è un mezzo di primaria importanza per lo svolgimento di indagini epidemiologiche. Un ostacolo a tale processo è la mancata o errata marcatura dei visceri con lesioni, rendendone impossibile l'associazione con la carcassa da cui provengono.

Altre fonti di dati utili alla sorveglianza possono essere i dati di vendita di prodotti farmaceutici; i dati provenienti da giardini zoologici o centri di recupero della fauna; le associazioni agricole; i dati sanitari/produttivi da allevamenti industriali intensivi; i dipartimenti governativi; le università; organizzazioni, enti e istituti per lo studio della fauna selvatica; i laboratori di ricerca; le aziende mangimistiche; gli istituti per la riproduzione animale; le banche del siero.

1.2.4 Meccanismi di sorveglianza

Notifica volontaria. Fornisce segnalazioni di sindromi nuove o riemergenti e di eventi morbosi rari o poco frequenti. La sua efficacia dipende strettamente dalla motivazione della fonte dei dati (liberi professionisti, università, ecc.) e può essere aumentata da specifiche campagne di sensibilizzazione e dall'offerta di incentivi economici. Ha costi bassi. Ha lo svantaggio della mancata o difficoltosa definizione della popolazione di riferimento così da rendere impossibile il calcolo delle misure di frequenza dell'evento morboso.

Denuncia obbligatoria. Si rivela un mezzo di sorveglianza efficace per malattie con sintomi clinici facilmente riconoscibili e permette il calcolo di indici di morbilità ed il confronto su base spaziale e temporale dei dati epidemiologici. Causa spesso errori di sotto-stima dovuti a diversi fattori che possono essere alla

base di una mancata notifica. Per gli allevatori la prospettiva delle perdite conseguenti alla segnalazione (sequestro o abbattimento dei capi) può disincentivare alla notifica, prevedere indennizzi e risarcimenti risulta quindi importante. La difficoltà nella stima della popolazione di riferimento non permette il calcolo di prevalenza e incidenza. I costi sono bassi nel caso di malattie a bassa prevalenza.

Indagine in corso di focolaio. La cosiddetta ‘sorveglianza sindromica’. Comporta l’esistenza di rapporti collaborativi tra allevatori/operatori e veterinari formati ed accordo nelle definizioni di ‘focolaio’ e di ‘livello di intervento’.

Sorveglianza delle sentinelle. Sono definiti gli eventi di interesse di cui si monitora il livello nella popolazione oggetto di indagine. Si distinguono fonti di informazioni primarie (ad esempio allevatori), secondarie (ad esempio veterinari liberi professionisti) e terziarie (laboratori diagnostici). L’integrazione di fonti diverse, corredate da informazioni aggiuntive (specie coinvolte, data e località, ecc) permette un’approfondita conoscenza dell’evento. Il ricorso a fonti primarie e secondarie presuppone la necessità di formazione degli osservatori preposti e spesso comporta la difficoltà al reclutamento di sentinelle rappresentative della popolazione. L’utilizzo di fonti terziarie (laboratori diagnostici) può rivelarsi utile nell’evidenziazione di malattie emergenti ma i risultati possono essere influenzati dalla frequenza di conferimento dei campioni ai laboratori. L’elaborazione di statistiche nazionali che indicano l’andamento di eventi morbosi a lungo termine e lo scambio di informazioni tra paesi permettono la pianificazione di un coordinamento internazionale sulle linee di intervento da attuare.

Sorveglianza strutturata. Viene analizzato un campione selezionato della popolazione oggetto di sorveglianza. Necessita di un piano di campionamento su basi statistiche che permetta il prelievo di un campione rappresentativo. I costi correlati dipendono dalle caratteristiche della malattia indagata e dal grado di precisione richiesto all’indagine.

1.3 CAMPIONAMENTO. BASI CONCETTUALI

La validità della teoria campionaria è basata sull'assunzione che un insieme di unità può essere suddiviso in sub-unità rappresentative, e che le caratteristiche dell'insieme possono essere stimate dalle sub-unità.

La popolazione bersaglio è la popolazione totale della quale è necessario studiare determinate caratteristiche. Idealmente, potrebbe essere rappresentata dalla popolazione a rischio. La popolazione oggetto di studio è la popolazione da cui è estratto il campione. Queste due popolazioni dovrebbero coincidere ma spesso ciò non è possibile. Se la popolazione oggetto di studio non è rappresentativa della popolazione bersaglio, i risultati ottenuti non possono essere generalizzati.

La popolazione oggetto di studio è costituita da unità elementari, che non possono essere ulteriormente divise. Una raccolta di unità elementari, raggruppate in base a caratteristiche comuni, costituisce uno strato. Prima di procedere alla raccolta di un campione è necessario identificare i membri della popolazione oggetto di studio, definendo la struttura del campione. Ciascun membro della struttura campionaria è un'unità campionaria. La frazione campionaria è il rapporto fra dimensione del campione e dimensione della popolazione di riferimento.

Le unità campionarie possono essere singoli animali (unità elementari) o aggregati come mandrie, allevamenti, regioni, e la stima della prevalenza può essere ottenuta in relazione alle differenti unità.

Nel corso di indagini sanitarie, è importante sottolineare la differenza tra 'unità epidemiologica' e 'unità campionaria' (Thrusfield, 2001). La prima è il gruppo di animali che risultano epidemiologicamente rilevanti nel mantenimento e nella trasmissione, oltre che nel controllo, dell'infezione. E' utile che unità epidemiologica e unità campionaria coincidano.

1.3.1 Metodi di campionamento non probabilistico

Campionamento non probabilistico, nel quale la scelta del campione è lasciata a colui che svolge l'indagine.

Campionamento di convenienza. Un campionamento di convenienza consiste nella raccolta di unità campionari facilmente accessibili. Quando la convenienza è il principale criterio per selezionare i campioni, molto difficilmente il campione sarà rappresentativo della popolazione oggetto di studi, ed i risultati saranno pregiudicati.

Selezione intenzionale. La selezione intenzionale è la scelta di un campione del quale la media delle caratteristiche quantitative o la distribuzione di quelle qualitative sono simili a quelle della popolazione studiata. Lo scopo è la selezione di un campione le cui caratteristiche siano bilanciate con quelle della popolazione bersaglio. Un tale tipo di selezione produce un campione che rappresenta solamente l'insieme delle unità campionarie delle quali nessun membro si allontana dalla media della popolazione, ed esclude tutti i possibili campioni con media lontana dalla media della popolazione, così che il campione non è rappresentativo, del resto come tutti i campioni risultato di una scelta intenzionale, e che la variabilità della popolazione oggetto di studio viene inevitabilmente sotto-stimata.

1.3.2 Metodi di campionamento probabilistico

Campionamento casuale semplice. Un campione casuale semplice è selezionato sulla base di una lista di tutti gli animali o di altre unità campionarie della popolazione di riferimento, dalla quale vengono prelevate casualmente le unità campionarie.

Campionamento sistematico. Il campionamento sistematico comporta la selezione di unità campionarie estratte ad intervalli uguali, il primo individuo estratto casualmente. Tale tipo di campionamento non richiede la conoscenza della dimensione totale della popolazione, mentre un campionamento casuale semplice

può essere effettuato solo se si identificano a priori tutti gli animali della popolazione. Teoricamente i campioni sistematici tendono ad essere distribuiti più uniformemente nella popolazione, ma in pratica danno risultati sovrapponibili a quelli ottenuti con un campionamento casuale semplice. Inoltre, la tecnica può rivelarsi controproducente nel caso in cui ci sia una periodicità nella lista campionaria.

Campionamento stratificato. Un campione semplice stratificato si ottiene dividendo la popolazione oggetto di studio in gruppi esclusivi (strati), e poi procedendo ad estrarre casualmente le unità campionarie da tutti i singoli strati. La stratificazione può migliorare l'accuratezza del campione perché, assicurando che ciascun gruppo venga rappresentato, permette di superare la tendenza del campionamento casuale semplice a sovra o sotto-rappresentare alcune sezioni della struttura campionaria. Il numero di unità campionarie da prelevare da ogni strato può essere definito con metodi diversi. Il più comune è il metodo dell'allocazione proporzionale, in base al quale il numero di unità campionarie selezionate è proporzionale al numero di individui in ogni strato. Questo metodo è il più conveniente nel caso in cui ci sia lo stesso costo nel campionare ciascun strato, mentre se ciò non si verifica sono da preferire altri e più complessi metodi di allocazione (Levy & Lemeshow, 1999).

Campionamento a cluster. Gli strati possono a loro volta essere raggruppati sulla base della localizzazione geografica, come differenti paesi, regioni, province o comuni, o categorizzati in base ad altre variabili quali ad esempio il periodo di tempo durante il quale vengono raccolti i campioni. Gli strati vengono così denominati clusters. Effettuare un campionamento da ciascuno di questi cluster può tuttavia risultare dispendioso e lungo, a meno che non si operi una selezione di pochi clusters nei quali raccogliere i campioni. Questa procedura viene definita campionamento a cluster. Solitamente vengono campionati tutti gli animali appartenenti ai clusters selezionati, e si parla di campionamento a cluster a uno stadio. Il campione può essere estratto anche in più di una fase: viene selezionata un

campione fra i clusters, nel quale si procede ad un sub-campionamento di alcuni animali. Questo campionamento è detto a cluster a due stadi, nel quale i clusters rappresentano le unità primarie, e gli individui selezionati nel sub-campione le unità secondarie. Se invece le unità secondarie consistono in gruppi di animali, si possono pianificare ulteriori stadi di campionamento, procedendo ad un campionamento a cluster multi-stadio.

Il campionamento a cluster può essere utilizzato quando non è disponibile una lista completa dei membri della popolazione; è sufficiente disporre di una lista delle unità primarie, e di una lista dei membri appartenenti alle unità selezionate. Questa tecnica campionaria si rivela utile e relativamente economica permettendo di concentrare il campionamento su una parte della popolazione, ma fornisce risultati meno precisi rispetto di altri metodi quali il campionamento casuale o sistematico sullo stesso numero di animali, poiché la prevalenza di malattia tende ad essere più variabile tra gruppi che all'interno dei gruppi.

Nel caso non sia possibile disporre dei dati demografici necessari alla costruzione della struttura del campione, i clusters possono essere definiti utilizzando le coordinate di una mappa suddivisa in quadranti per sovrapposizione di una griglia.

1.3.3 Stima della dimensione del campione

Il numero di animali che devono essere campionati nel corso di un'indagine epidemiologica dipende da considerazioni di ordine pratico, quali la manodopera a disposizione e la disponibilità di informazioni demografiche sulla struttura del campione, e di ordine statistico, cioè la precisione della stima della prevalenza e la prevalenza attesa per la malattia indagata.

La capacità di una metodica campionaria di determinare il valore reale di una variabile di una popolazione (la precisione del metodo) può essere espressa in termini di intervallo di errore accettato per la stima. L'errore può essere definito in termini assoluti o relativi. Ad esempio, un errore assoluto tollerato di $\pm 2\%$ per una

prevalenza di 40% rappresenta un intervallo accettabile di 38-42%. Un errore relativo del $\pm 2\%$ per la stessa prevalenza corrisponde al 2% del 40%, cioè ad una stima di $40\% \pm 0,8\%$, corrispondente ad un intervallo accettabile di 39,2-40,8%.

La prevalenza attesa della malattia, benché sembri un paradosso, è un'informazione necessaria nella definizione del piano di campionamento per un'indagine il cui fine è proprio la stima della prevalenza. Con valori attesi di prevalenza vicini allo 0% o al 100% l'intervallo di confidenza risultante sarà molto più stretto di quello ottenuto con un valore di prevalenza attesa attorno al 50%, così che nel primo caso sarà necessario un campione di dimensioni più ridotte per ottenere lo stesso intervallo di confidenza.

La dimensione del campione necessaria a stimare la prevalenza di malattia in una popolazione molto grande (teoricamente infinita) può essere stimata per una certa precisione ed un certo intervallo di confidenza. La formula classica utilizzata nel campionamento casuale semplice per un intervallo di confidenza del 95% è:

$$n = 1.96^2 P_{\text{exp}} (1-P_{\text{exp}}) / d^2 ,$$

dove n = dimensione del campione P_{exp} = prevalenza attesa d = precisione assoluta desiderata.

Esistono tabelle che possono essere consultate e per ciascun valore di prevalenza attesa, precisione ed intervallo di confidenza prescelti forniscono il numero di campioni necessario (vedi allegato I e II). Tali tabelle come la formula sopra riportata sono basate sull'approssimazione normale alla distribuzione binomiale, approssimazione accettabile nel caso la dimensione della popolazione oggetto del campionamento sia grande rispetto a quella del campione. Al crescere della dimensione del campione rispetto a quella della popolazione, diminuisce la varianza della stima della media della popolazione e si riduce l'ampiezza dell'intervallo di confidenza. In popolazioni relativamente piccole è possibile selezionare un campione in proporzione più ridotto di quello necessario per popolazioni

teoricamente infinite per ottenere lo stesso livello di precisione. Così, è possibile utilizzare una formula che corregge la dimensione campionaria richiesta per popolazioni non infinite:

$$n_{\text{adj}} = N \times n / N + n,$$

dove n è la dimensione del campione basata su una popolazione infinita e N è la dimensione della popolazione oggetto dell'indagine. Risulta utile calcolare il valore di n_{adj} nel caso in cui n rappresenti più del 5% di N .

Nel caso, frequente, in cui nell'indagine siano utilizzati test 'imperfetti', cioè con una sensibilità e specificità diagnostiche inferiori al 100%, generando risultati falsi-negativi e falsi-positivi e fornendo quindi una stima della prevalenza, piuttosto che una prevalenza reale, è corretto calcolare la dimensione del campione con includendo i valori di sensibilità e specificità del test utilizzato (Thrusfield, 2005).

1.3.4 Stima della presenza di malattia

Se lo scopo di un'indagine è quella di sapere se una malattia sia presente o meno in un gruppo di animali (senza stimarne la prevalenza), la dimensione adeguata del campione può essere calcolata usando la formula secondo Cannon e Roe (1982):

$$n = \{1 - (1 - p_1)^{1/d}\} \{N - d/2\} + 1$$

dove n = dimensione del campione; N = dimensione della popolazione; d = numero minimo di animali positivi attesi nella popolazione; p_1 = probabilità di rilevare almeno una positività nel campione.

Anche in questo caso si può far ricorso a tabelle che riportano, per una probabilità di rilevare almeno un positivo pari al 90%, 95% o 99%, la dimensione del campione

necessaria per diversi valori di prevalenza e diverse dimensioni della popolazione oggetto dell'indagine (Allegato II), come riportato da Cannon e Roe (1982). Utilizzando la formula o le tabelle citate si assume in questo caso che il test diagnostico utilizzato possieda una sensibilità ed una specificità pari al 100%, condizione non sempre realistica (Cameron e Baldock, 1998). E' possibile includere il valore di sensibilità e specificità del test diagnostico utilizzando formule complesse che restituiscono non solo la dimensione del campione corretta, ma anche il numero massimo di animali del campione che possono risultare positivi supponendo che la malattia sia assente dalla popolazione al livello minimo di prevalenza specificato, assumendo quindi che tra i positivi rilevati ci siano dei falsi positivi (Thrusfield, 2005).

Il metodo sopra descritto risulta utile anche nel caso in cui il calcolo della dimensione del campione per la rilevazione della presenza della malattia in una popolazione sia applicato quando l'unità di campionamento è costituita da aggregazione di animali. Il calcolo della numerosità campionaria si risolve in questo caso ad una procedura a due stadi, che include la definizione del numero di gruppi che devono essere campionati e il numero di animali da prelevare in ciascun aggregato.

1.3.5 Calcolo degli intervalli di confidenza

E' possibile calcolare un intervallo di confidenza del 95% per un campione casuale semplice per una dimensione campionaria n ed una prevalenza stimata P usando la formula seguente, basata su un'approssimazione normale della distribuzione binomiale:

$$P - 1,96 \sqrt{P (1-P) / n}, \quad P + 1,96 \sqrt{P (1-P) / n}$$

La formula assume che la popolazione dalla quale il campione è estratto è grande, e

che la frazione campionaria f è piccola; se ciò non avviene, e il campione rappresenta più del 10% della popolazione intera, il numeratore $P(1-P)$ deve essere moltiplicato per $(1 - f)$. La formula inoltre assume che $P \geq 0,05$ e $\leq 0,95$ e che nP e $n(1-P) \geq 5$. Nel caso sia disponibile solo un campione molto piccolo, il termine $n(1-P)$ può essere minore di 5 e diventa necessario il calcolo degli esatti intervalli di confidenza basandosi sulla distribuzione binomiale (Altman *et al.*, 2000).

Nel caso di malattie a bassa prevalenza, se viene applicata un'approssimazione normale alla distribuzione binomiale risulta necessario un campione molto numeroso per stimare un intervallo di confidenza accettabile. Se la prevalenza di malattia attesa è inferiore allo 0,02% è possibile utilizzare un metodo alternativo basato sulla distribuzione di Poisson (Altman *et al.*, 2000).

1.4 SORVEGLIANZA E MONITORAGGIO DELLE MALATTIE DELLA FAUNA SELVATICA

E' ormai ampiamente riconosciuto come nei paesi in cui si attua una sorveglianza delle malattie delle popolazioni di animali selvatici sia più probabile la comprensione dell'epidemiologia di specifiche infezioni e di zoonosi all'interno dei loro confini e migliore la preparazione alla difesa della salute di fauna selvatica, domestica e dell'uomo (Morner et al, 2002). Nel *Report* del *Working Group* sulle malattie della fauna selvatica dell'*Office International des Epizooties* (OIE: Organizzazione Mondiale per la Salute animale) presentato alla 6° sessione generale del Committee internazionale è riportato che le attività di traslocazione di animali selvatici sono in aumento, con il rischio economico, sanitario ed ambientale della concomitante introduzione di malattie. Nel *Report* inoltre si ricorda come la sorveglianza delle malattie della fauna selvatica rappresenta una necessità di crescente importanza e che un paese non può dichiarare la presenza o l'assenza di un'infezione nelle popolazioni selvatiche nel suo territorio senza un aver condotto un adeguato campionamento e non aver sottoposto i dati ad analisi statistica. Chiaramente, la nozione di "assenza di evidenza" o "evidenza di assenza" è importante per le popolazioni selvatiche come lo è per quelle domestiche. Programmi regolari di monitoraggio diventeranno sempre più parte della verifica dello stato di libertà da specifiche malattie di una nazione e della conferma dello stato sanitario delle popolazioni a vita libera.

Le malattie della fauna selvatica si manifestano in molte forme in una vasta gamma di specie e popolazioni, e possono avere un impatto significativo sull'ecologia delle popolazioni ospiti (Morner *et al.*, 2002). Mentre alcune malattie sono presenti nelle popolazioni selvatiche in forme asintomatiche o subcliniche senza nessun apparente impatto sull'ecologia delle popolazioni selvatiche e nessuna conseguenza per la salute delle specie domestiche e dell'uomo, occasionalmente si verificano drammatici focolai epidemici caratterizzati da mortalità e morbilità elevate.

Inoltre, gli animali selvatici possono essere serbatoio di malattie comprese nella

lista dell'OIE, come di altre malattie importanti per la salute degli animali domestici e dell'uomo. Di conseguenza, la sorveglianza attiva di malattie di riconosciuta importanza da un punto di vista economico e per la salute pubblica si rivela di particolare interesse nazionale. In precedenza, c'era la concezione che la notifica di una malattia denunciabile, come quelle nella lista OIE, nella fauna selvatica potesse penalizzare un paese esportatore, soprattutto nel caso in cui tale malattia non fosse presente nelle popolazioni di animali domestici. L'identificazione di malattie notificabili nelle popolazioni selvatiche non dovrebbe necessariamente ripercuotersi sul commercio (principio della compartimentazione). Tutti i paesi dovrebbero essere incoraggiati a sviluppare e mantenere attivi programmi di sorveglianza delle malattie della fauna selvatica che completino e supportino i programmi nazionali di sorveglianza della sanità animale.

La sorveglianza delle malattie delle popolazioni selvatiche comprende l'identificazione della presenza della malattia oggetto di ricerca, la stima della sua prevalenza e della sua distribuzione spaziale, ed il monitoraggio del suo andamento e della sua evoluzione. I metodi di campionamento probabilistici appropriati per raggiungere gli obiettivi della sorveglianza sono poco familiari a molti specialisti della fauna selvatica, per la maggior parte biologi la cui formazione è basata su studi sperimentali nei quali i concetti di controllo, manipolazione, e ripetizioni sono pietre miliari. Inoltre, molti biologi si approcciano alla stima solo attraverso le indagini più semplici quali il campionamento casuale semplice e stratificato.

Le indagini campionarie si basano su campionamenti probabilistici per definire unità di campionamento (ad esempio aree o individui) all'interno delle popolazioni di interesse. Il campionamento probabilistico è molto spesso usato quando l'obiettivo è la stima di medie o totali di popolazione come la prevalenza di malattia ed il numero di animali ammalati nella popolazione, ed è anche applicato dalle agenzie di governo per monitorare i cambiamenti nella disponibilità delle risorse. Nel disegno campionario, sono applicate regole ben definite per la selezione casuale di un campione che concettualmente sia rappresentativo della popolazione oggetto

di studio. Quando si procede a campionare la fauna selvatica, spesso il campione è rappresentato da una lista di aree mutualmente esclusive (plots di territorio) che contengono gli animali (elementi della popolazione). Le regole per la selezione ed il modello di campionamento permette di calcolare la probabilità che un'unità di campionamento e/o un elemento della popolazione sia incluso nel campione e di ottenere degli indici adeguati per uno specifico disegno campionario. Essendo le probabilità di selezione conosciute, si possono derivare valide proprietà statistiche delle stime ottenute, permettendo una validazione del metodo utilizzato.

Benché negli studi sulla fauna selvatica si affermi di procedere con campionamenti casuali, molto spesso le osservazioni sono ottenute in varie maniere, nessuna delle quali si può definire casuale (ad esempio gli animali abbattuti o quelli investiti). Quando viene utilizzato tale forma di campionamento di convenienza, la probabilità di selezione non può essere descritta con metodi analitici, risultando pertanto impossibile ricavare degli indici validi o corretti errori standard. In pratica, vengono fatte assunzioni non scientifiche e totalmente prive di fondamento riguardo alla convinzione che un campione di convenienza sia rappresentativo della popolazione. Il problema da analizzare è la necessità pratica di trattare con dati empirici negli studi sulla fauna selvatica. Shaffer e Johnson (2008) hanno già trattato della possibilità di randomizzare il trattamento per stabilire le potenziali relazioni di causa-effetto. Un altro tipo di problema è la descrizione di una popolazione in un certo momento o in un certo periodo di tempo (ad esempio, stimare la prevalenza, puntuale o di periodo, di una malattia), problema che richiede che i dati siano raccolti con un campionamento statisticamente significativo (ad esempio, campioni probabilistici che possono essere utilizzati per ottenere stime valide riguardo alla popolazione studiata). Proprio come uno studio sperimentale è un metodo scientificamente rigoroso di verificare l'effetto di un trattamento sulla popolazione, un'indagine campionaria è un metodo riconosciuto e realizzabile per stimare le caratteristiche della popolazione. Oltre alle stime basate su un disegno campionario, le stime basate su un modello matematico (che ad esempio include correlazioni e

tendenze spaziali) o quelle ottenute da una combinazione dei due metodi possono rivelarsi un approccio efficace al problema (Ver Horf, 2002).

Benché le metodiche di pianificazione del campionamento della fauna selvatica siano migliorate negli ultimi 25 anni, nel corso di piani di sorveglianza sanitaria o di indagini di campo vengono comunque spesso utilizzate metodiche di selezione del campione non probabilistiche. I ricercatori che si occupano di fauna selvatica riconoscono l'impraticabilità del campionamento casuale, ed utilizzano diverse che vanno a ricalcare piani di campionamento più complessi. Ad esempio, i ricercatori possono campionare da segmenti separati della popolazione, mimando un campionamento stratificato su basi probabilistiche, o utilizzare più risorse focalizzando il campionamento su certe unità che forniscono maggiori informazioni (per esempio gli individui con sintomi di malattia), applicando un concetto simile a quello del campionamento su probabilità eterogenea. Facendo questo, gli specialisti della fauna utilizzano conoscenze acquisite, come ad esempio le preferenze ambientali di una certa specie, per indirizzare il processo di osservazione verso una stima apparentemente più rappresentativa della popolazione oggetto di studio. Meno frequentemente i ricercatori valutano le dimensioni ottimali del campione o confrontano l'efficacia di piani diversi sulla base delle risorse disponibili (Thompson, 2002).

La notifica di episodi di malattia o mortalità che coinvolgono popolazioni selvatiche può rappresentare il primo stadio dell'allerta per la probabile presenza di un nuovo agente eziologico. Un intervento ed un'indagine precoci di questi episodi inusuali o inaspettati di malattia sono essenziali allo scopo di determinare la rilevanza e la causa di questi focolai. Segnalazioni di questa natura possono rappresentare la prima indicazione dell'introduzione di un agente patogeno esotico. Esempi includono l'introduzione in nuove aree di virus veicolati da vettori artropodi, come il virus West Nile, o la diffusione di malattie in nuove aree dovuta a repentini cambiamenti climatici o ecologici, come nel caso dell'epidemia di cecità dei canguri da Orbivirus.

La scoperta di importanti agenti di malattia nella fauna selvatica può anche essere il risultato di attività di sorveglianza passiva, come è capitato per l'aumento di mortalità dei caprioli in Europa nei decenni passati. Sono molti i casi in cui l'evidenziazione di malattie in popolazioni selvatiche è avvenuta in seguito del conferimento routinario di materiale biologico ai laboratori diagnostici. Inoltre, la ricerca di agenti di malattia nel potenziale ospite selvatico può essere il risultato della diagnosi di infezioni che colpiscono l'uomo, come è avvenuto in Australia per l'infezione da Lyssavirus dei pipistrelli e in Malaysia per l'infezione da virus Nipah (Morbillivirus), o gli animali domestici, come nel caso dei virus Hendra e Menangle associati ai pipistrelli.

Molti programmi nazionali di monitoraggio sanitario includono specie selvatiche a vita libera o allevate. Normalmente vengono attivati programmi di monitoraggio della fauna selvatica a supporto dei programmi nazionali a difesa della sanità animale, della sicurezza del trasporto e della commercializzazione dei prodotti di origine animale, e della salute pubblica. Parte della strategia di monitoraggio delle malattie della fauna selvatica include la capacità di indagare sugli episodi di mortalità di massa ed aumento della morbilità e le sindromi da nuovi patogeni (come la malattia emorragica del coniglio e la sindrome della lepre bruna europea da Calicivirus), identificare e classificare nuovi patogeni e monitorare lo stato delle malattie note nelle popolazioni selvatiche.

A parte le dirette implicazioni economiche, sulla salute pubblica e sul commercio legate alla presenza di malattie nella fauna selvatica, il verificarsi di episodi di mortalità di massa e di focolai inattesi in popolazioni selvatiche può rivelarsi un indicatore importante di disequilibri ecologici, introduzione di nuove specie, di nuovi agenti patogeni, di cambiamenti climatici ed ambientali, di inquinamento degli habitat.

1.4.1 Monitoraggio degli eventi di mortalità nella fauna selvatica

Gli eventi di mortalità di massa che coinvolgono popolazioni selvatiche sono spesso imprevedibili e inattesi. Gli esempi comprendono il rinvenimento di mammiferi marini, pesci o uccelli marini sulle spiagge o nei tratti di mare adiacenti la costa, la scoperta di uccelli morti in boschi, aree agricole o urbane, e casi di mortalità di massa nei parchi o nelle riserve naturali. Più comunemente, gli animali selvatici morti vengono portati ai laboratori diagnostici da conduttori di fondi, cacciatori o gente comune. Tale forma di raccolta passiva può offrire un'ulteriore opportunità di svelare diverse forme patologiche associate a vari agenti di malattia. Isolati, questi conferimenti potrebbero rappresentare un mero record inserito nel database del laboratorio. In realtà, queste conferimenti acquisiti passivamente possono fornire importanti informazioni riguardo l'evolversi di eventi patologici che coinvolgono la fauna selvatica. La significatività di tali informazioni può diventare manifesta solo in una visione a lungo termine come è accaduto, ad esempio, per gli studi sulla lepre in Europa.

La maggior parte delle indagini sugli eventi di mortalità naturale nelle popolazioni selvatiche non si basano su un campionamento statistico e random. Si tratta di una raccolta di varie malattie, di diverse cause di morte, spesso associate a parziali informazioni sulla reale distribuzione dei casi. Questo genere di dati fornisce scarse informazioni epidemiologiche. Un altro aspetto da considerare è la ragione o la motivazione che spinge al conferimento di campioni, poiché una maggiore attenzione da parte dell'opinione pubblica può tradursi in un aumentato sforzo di raccolta e conferimento di campioni. Se il pubblico o i mezzi di comunicazione percepiscono come emergente e importante una malattia della fauna selvatica, aumenterà la risposta del pubblico, e con essa il numero di campioni consegnati.

Per valutare la significatività di un evento di mortalità da malattia nelle popolazioni selvatiche può essere necessario tentare di misurare o di valutare il tasso di mortalità, obiettivo questo non sempre facile. Registrare il numero degli animali

morti e nello stesso tempo stimare la dimensione della popolazione locale a rischio può incorrere in una serie di errori. Nel corso di indagini sulle malattie da fauna selvatica, gli animali infetti o malati sono stati marcati e monitorati nel tempo. Per loro natura, questo genere di studi coinvolgono un ristretto range di ospiti e popolazioni, e si svolgono in un arco di tempo breve. Metodi di indagine alternativi consistono nell'utilizzo della tecnica del radio-tracking per il monitoraggio della sopravvivenza degli animali marcati (come nel caso dello studio sulla malattia emorragica del cervi e della rabbia nel tasso).

Per lo studio di malattie significative della fauna selvatica, la sorveglianza attiva rappresenta l'approccio migliore. I programmi di sorveglianza attiva si propongono di raccogliere un certo numero di campioni da una popolazione bersaglio (di animali sia vivi che morti) per valutare la prevalenza puntuale di certe infezioni usando tecniche per evidenziare l'antigene o anticorpi specifici. Una volta identificato l'agente patogeno, gli esami sierologici supportati da accurati test specie-specifici sono il mezzo più utilizzato per valutare attivamente la diffusione e la distribuzione dell'infezione nella popolazione selvatica oggetto di studio (Corner *et al*, 2002).

La capacità di prevenire e reagire efficacemente ad episodi inattesi di mortalità e morbilità che coinvolgono la fauna selvatica dipende dalle conoscenze pregresse acquisite in merito a tali eventi. Le malattie infettive devono sempre essere incluse nelle possibili cause. Il campionamento nel corso di focolai epidemici può essere minimo, opportunistico e selettivo. In ogni caso, dopo una prima valutazione preliminare dei risultati di laboratorio, sarebbe auspicabile che seguisse un secondo campionamento più esaustivo. E' plausibile che nelle aree più remote, un residente o un biologo di campo rilevi un'anomala morbilità, mortalità o malattia clinica nella fauna selvatica. Nel caso l'indagine iniziale sia affidata a personale poco qualificato, risulterà di primaria importanza il contatto con gli specialisti e l'elaborazione di dettagliate istruzioni sulle modalità di raccolta e conservazione dei campioni. Con il tempo, lo sviluppo di specifici piani d'azione e la redazione di manuali operativi,

uniti ad attività di formazione, miglioreranno l'efficacia dell'azione di operatori sul campo e ricercatori nel rispondere all'emergenza. Saranno utili anche lo sviluppo di reti nazionali ed internazionali per la segnalazione di malattie della fauna selvatica e la diffusione di moduli formativi per lo svolgimento delle indagini.

Il monitoraggio della presenza di malattia e la valutazione dello stato sanitario della fauna selvatica sono normalmente basati sul presupposto che qualsiasi dato patologico raccolto da animali appartenenti a popolazioni a vita libera possano fornire informazioni sul rapporto ospite-agente eziologico all'interno di una data popolazione e di un dato ambiente.

Per verificare se un evento di mortalità o morbilità è di natura infettiva, è importante raccogliere il maggior numero possibile di dati relativi all'incidente. Benché spesso risulti difficile disporre di animali morti o malati da esaminare, dovrebbero comunque essere fatti dei tentativi per stimare il loro numero e rapportarlo alla dimensione della popolazione totale potenzialmente esposta a rischio. E' inoltre importante relazionare l'insorgenza della malattia ad altri fattori ambientali che potrebbero predisporre al manifestarsi della malattia, oltre a predisporre una sequenza temporale degli eventi (time-line).

L'identificazione precoce delle malattie si rivela essenziale nell'approntare una reazione pronta, ma verificare con relativa certezza la presenza, ed ancor di più l'assenza, di una malattia o valutare il tempo entro il quale una malattia viene identificata risulta estremamente difficile per le proprietà statistiche proprie della determinazione degli eventi rari (Doherr e Audige, 2001; Venette *et al.*, 2002).

1.4.2 Campionamento e malattie della fauna selvatica: limiti e peculiarità

E' intrinsecamente più complesso monitorare lo stato sanitario della fauna selvatica rispetto a quanto avviene negli animali domestici. Gli animali selvatici non sono rinchiusi in recinti e possono muoversi su ampi areali. Questo risulta

particolarmente evidente per uccelli e mammiferi migratori che stagionalmente si spostano attraverso continenti ed oceani. Le opportunità di campionamento sono poche e su brevi archi temporali, oltre ad essere spesso legate a siti di alimentazione o riproduzione.

Gli animali selvatici occupano ambienti naturali in diverse maniere. Per le specie che si aggregano in grandi numeri in spazi aperti, eventi di mortalità inusuale sono facilmente visibili ed identificabili (ad esempio presso i siti di alimentazione, e nelle colonie nella stagione riproduttiva). Nel caso di specie più elusive, o che abitano aree remote (come le zone polari, i deserti o altre aree disabitate), o aree montagnose o zone di giungla e foreste inaccessibili, la presenza di eventi patologici può emergere solo come il risultato di raccolta casuale di materiale biologico e come risultato di sforzi di sorveglianza attiva. Specie a vita libera che sono di piccola taglia o che sono difficilmente reperibili nel loro ambiente naturale possono essere colpite da eventi di mortalità di massa non segnalati per anni o decenni. Spesso la sola indicazione di una patologia che sta causando mortalità in una popolazione selvatica è il declino locale o l'estinzione di alcune specie. Unicamente attraverso programmi che prevedono catture sistematiche e campionamenti mirati si può giungere alla comprensione delle vere cause del declino osservato.

A parte specie gregarie o che vivono in grossi raggruppamenti e possono così raggiungere numerosità di decine di migliaia di individui, gli animali selvatici vivono anche in piccoli gruppi, come le coorti familiari, o occupano territori come singoli individui solitari o come coppie. Inoltre, l'area occupata può variare da home range limitati di pochi ettari, a vastissimi range coperti durante movimenti nomadi di centinaia o migliaia di chilometri. Molte specie selvatiche compiono movimenti migratori stagionali durante i quali sono sottoposti a stress climatici e nutrizionali. L'esposizione stagionale a artropodi vettori rende spesso la fauna selvatica ospite e mezzo di diffusione di una vasta gamma di malattie parassitarie, virale e batteriche trasmesse per via ematica.

Una mortalità/morbilità di massa nelle popolazioni selvatiche rappresenta una sfida per gli studiosi delle malattie della fauna, rappresentando i focolai di mortalità o morbilità inattese un'opportunità di raccolta ed elaborazione di dati di campo e permettendo di verificare l'efficacia dei protocolli diagnostici per l'individuazione dell'agente patogeno e della sua epidemiologia.

Un episodio di malattia che riguarda la fauna selvatica può inizialmente non essere segnalato o studiato. Solo una discussione multidisciplinare e piani di campionamento esaustivi possono svelare la natura e l'epidemiologia dell'evento patogeno. Spesso risulta difficile seguire con continuità la sequenza degli eventi nel corso di un focolaio epidemico, poiché le informazioni sui segni clinici e sull'evoluzione della malattia possono essere incomplete. Inoltre, se avviene l'introduzione di un nuovo agente eziologico in una popolazione totalmente recettiva, la diffusione dell'infezione avverrà con indici di mortalità e morbilità particolarmente elevati, e risulterà utile mettere in relazione il tasso di diffusione con variabili stagionali, geografiche e climatiche. Naturalmente si rivelano di primaria importanza alla comprensione della patogenesi della malattia in oggetto studi sperimentali su trasmissione e recettività.

Eventi di mortalità di massa spesso si verificano in luoghi di aggregazione delle specie selvatiche, come i siti riproduttivi o di alimentazione. Frequentemente vengono colpiti da morie di natura infettiva gli uccelli acquatici migratori in Nord America, come nel caso delle epidemie di colera aviario e botulismo, malattia di Newcastle e influenza aviaria.

Le indagini e il monitoraggio di episodi di mortalità nella fauna selvatica dovrebbero permettere di raccogliere il maggior numero possibile di informazioni dalle poche carcasse disponibili. Un adeguato programma di campionamento dovrebbe prevedere la raccolta di dati quantitativi e qualitativi (riguardo alla specie coinvolta, al comportamento, a rilievi clinici, a osservazioni anatomico-patologiche, ecc). Il prelievo di campioni ematici, come di campioni di tessuto adeguatamente conservati, permetterà di supportare le indagini per giungere all'identificazione

degli agenti patogeni coinvolti. L'identificazione dell'agente patogeno è indispensabile alla comprensione dei meccanismi di trasmissione.

Possono presentarsi difficoltà pratiche nella valutazione del tasso di mortalità come proporzione calcolata sulla popolazione a rischio. Gli animali selvatici possono essersi dispersi dopo un episodio epidemico, rendendo impossibile la valutazione del tasso di mortalità e morbilità.

Può rivelarsi difficile anche la scoperta e la conta degli animali morti e/o malati.

Ormai è accertata la necessità di programmi di sorveglianza delle malattie della fauna selvatica, e le ragioni sono diverse. In Europa, la rabbia silvestre rappresenta uno storico esempio di tentativo di raccogliere sistematicamente campioni per la diagnosi e per ottenere informazioni fruibili alle pubbliche amministrazioni per la tutela della salute umana e animale. Quando la rabbia si diffuse in tutta l'Europa, emerse la necessità di una cooperazione internazionale e di programmi di sorveglianza per contenere la diffusione dell'infezione.

In Europa l'Organizzazione Mondiale per la Sanità (World Health Organization, WHO) ha creato un centro per il monitoraggio dei casi di rabbia su scala continentale per informare i paesi membri della situazione epidemiologica con cadenza quadrimestrale. Il primo bollettino risale al 1977. Questo è stato il primo tentativo di circolazione delle informazioni in Europa su malattie della fauna selvatica.

Tra i primi programmi di sorveglianza di malattie della fauna selvatica ricordiamo quelli attuati in Danimarca negli anni '30 ed in Svezia negli anni '40. Questi programmi erano basati sull'esame dei campioni conferiti ai laboratori veterinari. Questi programmi hanno rilevato in Svezia il problema degli avvelenamenti da mercurio di animali selvatici negli anni '50, ed operavano con un laboratorio centrale che raccoglieva campioni da ogni parte del paese. Attualmente programmi simili sono in corso in Danimarca, Norvegia e Finlandia.

PARTE II
INFLUENZA AVIARE. ECOLOGIA ED EVOLUZIONE

2.1 INFLUENZA AVIARE. ECOLOGIA ED EVOLUZIONE

L'influenza è una patologia infettiva che colpisce uccelli e mammiferi, causata da un RNA virus appartenente alla famiglia delle Orthomixoviridae, genere Influenzavirus.

La patologia è caratterizzata da una sintomatologia prettamente respiratoria dato il tropismo del virus per le cellule presenti nelle vie respiratorie superiori e nei polmoni, ma la malattia può assumere sfumature cliniche diverse in relazione al tipo e alla gravità dei sintomi; tali differenze rappresentano l'espressione della grande varietà di sub-tipi e di profili di patogenicità posseduti dai virus influenzali di tipo A. La continua evoluzione dei virus e la continua emergenza di un sub-tipo dominante rispetto agli altri li rende potenzialmente in grado di determinare grave patologia nelle specie avicole nonché causa di epidemia annuale nell'uomo, e, qualora vengano soddisfatte determinate caratteristiche, responsabili di disastrose pandemie. Le epidemie influenzali del pollame sostenute da virus aviari ad alta patogenicità furono inizialmente riconosciute in Italia nel 1878 in seguito alla diffusione di una grave patologia respiratoria caratterizzata da alta mortalità tra il pollame allevato della Lombardia, e la malattia fu denominata Peste Aviare (*Fowl Plague*), ad indicare gli effetti devastanti provocati dalla circolazione di un virus influenzale all'interno di un allevamento (Perroncito, 1878). Negli anni successivi si verificarono frequenti focolai sostenuti da HPAI virus con effetti più o meno marcati sulle produzioni, sino all'emergenza dell'H5N1 nel 1997 nei paesi del Sud Est Asiatico.

Nell'uomo, oltre a causare le epidemie influenzali annuali, causa di mortalità per la fascia di popolazione più anziana e affetta da patologie croniche, i virus influenzali sono stati responsabili delle tre devastanti pandemie del secolo scorso, e la recente comparsa dell'H5N1 lo ha reso oggetto di studio in quanto potenziale responsabile di una nuova pandemia. I virus influenzali possono infettare una gran varietà di ospiti, mammiferi e uccelli, ma gli uccelli selvatici acquatici fungono da reservoir,

albergando tutti i 16 subtipi di HA e i 9 subtipi di NA presenti, e garantendone il mantenimento. All'interno di queste specie infatti si è creato un equilibrio ospite-virus che permette un'infezione asintomatica degli animali con contemporanea eliminazione di una notevole quantità di virus. L'ecologia delle specie, in particolare la tendenza gregaria e l'utilizzo delle zone umide come habitat principale e punto di congregazione di molti esemplari anche appartenenti a specie diverse li rende ancora più adatti come serbatoio naturale di virus dotati di gran trasmissibilità e resistenza nell'ambiente acquatico.

Un'ulteriore caratteristica della maggior parte delle specie reservoir è la migrazione stagionale. L'effettuazione nel corso dell'anno di due viaggi, uno verso le zone di riproduzione e uno verso le zone di svernamento offre la possibilità, supposto che gli animali infetti siano asintomatici e in grado di effettuare un normale cammino migratorio, di una trasmissione dei virus a lunga distanza che ripercorra le zone visitate dagli animali durante il viaggio. La conoscenza della distribuzione delle principali zone umide visitate dagli uccelli selvatici potrebbe permettere di prevedere, almeno teoricamente quali zone di un Paese siano più a rischio di introduzione di virus influenzali, e di dirigere verso queste le azioni di monitoraggio e sorveglianza degli uccelli selvatici acquatici, nonché di attuare misure volte a diminuire il rischio di contatto diretto e indiretto tra uccelli selvatici e pollame domestico.

2.1.1 Eziologia

I virus influenzali appartengono alla famiglia delle Orthomixoviridae, genere Influenzavirus, e sono gli unici componenti della famiglia. Sono distinti i tipi virali A, B e C e thogotovirus, microrganismo veicolato dalle zecche. I virus vengono classificati appartenenti al tipo virale A B o C in base alla differenza antigenica delle due proteine NP e M1 che vengono chiamati "antigeni tipo specifici". I virus influenzali di tipo A sono comunemente isolati da una grande varietà di ospiti,

uccelli e mammiferi uomo compreso; è l'unico tipo virale tra i tre veicolato dagli uccelli e in grado di causare pandemie nell'uomo. Il tipo B presenta uno spettro d'ospite esclusivamente limitato all'uomo ed è una importante causa di morbilità generalmente su scala regionale, causa di scarsa mortalità, riguardo al tipo C si conosce poco e non sembra essere particolarmente patogeno (Earn *et al.*, 2002).

Il virione è piccolo, con diametro compreso tra gli 80 e 120 μm , pleomorfo, rivestito da un *envelope* derivante dalla membrana cellulare dell'ospite in cui vengono incorporate tre glicoproteine di sintesi virale: la NA e la HA che rappresentano i principali antigeni di superficie e la glicoproteina M2. Tra il nucleocapside e l'*envelope* si interpone, costituendo una sorta di involucro posto al di sotto dell'*envelope*, la proteina M1 o proteina di matrice.

Il nucleocapside ha simmetria elicoidale e contiene il genoma virale, costituito di 8 segmenti di RNA *single strand* a polarità negativa, che codificano per 10 proteine virali.

Gli otto segmenti in cui è frammentato il genoma virale contengono 10 geni che codificano per 10 proteine, 8 proteine strutturali (PB2 polimerasi, PB1 polimerasi, PA polimerasi, HA, NP, NA, M1, M2) e 2 non strutturali, localizzate nel citoplasma della cellula ospite. Tutte queste proteine sono codificate da segmenti singoli e separati dell'RNA virale ad eccezione delle proteine non strutturali e delle proteine M1 e M2. La caratteristica di possedere un genoma segmentato, e la scarsa efficienza di correzione della RNA polimerasi, conferisce a questi virus una caratteristica di instabilità genetica.

Per questi virus infatti, è stimata una frequenza di errore pari ad una base nucleotidica per ogni ciclo di replicazione virale (Drake, 1993). Se questi cambiamenti nella composizione genetica avvengono in presenza di pressioni selettive da parte del sistema immunitario dell'ospite, mutanti che presentino una modificazione vantaggiosa per l'ecologia del virus possono essere selezionati e divenire il ceppo virale predominante all'interno di quell'ospite. Dato che i principali target del sistema immunitario dell'ospite sono le glicoproteine di

superficie HA e NA, le variazioni importanti dal punto di vista dell'ecologia del virus riguardano la composizione aminoacidica di tali proteine. Questo fenomeno di continue mutazioni puntiformi che possono condurre alla comparsa di nuove varianti ecologicamente avvantaggiate, è conosciuto come Antigenic Drift.

Un'altra strategia propria dei virus influenzali, che permette loro di modificare la propria costellazione genica, è il riassortimento genico o Antigenic Shift. Questo fenomeno si verifica quando una cellula animale è simultaneamente infettata da due differenti virus influenzali ed è determinato dal fatto che l'incorporazione dei segmenti neotrascritti di RNA virale durante la costituzione dei nuovi nucleocapsidi è parzialmente casuale.

Il virione di nuova sintesi pertanto può possedere un genoma costituito da segmenti provenienti dal genoma di entrambi i virus parenti. Se il nuovo virione possiede tutti gli otto segmenti di RNA necessari per il ciclo di replicazione virale compare un nuovo ceppo virale vitale e infettante. E' stato calcolato che la contemporanea infezione di una cellula con due virus influenzali differenti può dare origine fino a 256 discendenti diversi (Webster e Walker, 2003). Il meccanismo sopra descritto è ritenuto essere alla base della comparsa di ceppi virali responsabili di storiche pandemie nell'uomo, successivamente alla ricombinazione tra virus di origine umana e virus aviari all'interno di un terzo ospite non aviare e non umano, sensibile all'infezione con ambedue i virus. Il ruolo di "mixing vessel", ovvero di sito di ricombinazione dei virus influenzali, sulla base di considerazioni di carattere epidemiologico e di evidenze di tipo biochimico e molecolare, è stato affidato al suino.

Un terzo meccanismo che potrebbe contribuire alla comparsa di nuove varianti è stato dimostrato essere la ricombinazione intramolecolare del genoma virale con mRNA cellulare (Webster *et al.*, 1992).

Le proteine PB1, PB2 e PA fanno parte del complesso delle polimerasi ed hanno attività endonucleasica, trascrittica e di replicazione dell'RNA. Tutte sono localizzabili nel nucleo di cellule infette. NP (nucleoproteina), il primo antigene

tipo specifico è fondamentale per la sintesi di RNA virale. M2 è una proteina che funge da canale ionico, controlla il flusso protonico in modo da mantenere il pH costante all'interno del reticolo di Golgi durante la sintesi dell' HA. Le proteine non strutturali NS1 e NS2 sono fondamentali nel processo di replicazione del virus per quanto il loro ruolo preciso non sia ben stabilito.

La HA o emoagglutinina è una glicoproteina di membrana ed è il principale antigene di superficie. Ha la funzione di permettere l'assorbimento del virus da parte della cellula ospite mediante la fusione dell'envelope alla membrana cellulare successivamente al legame dell'estremità libera della proteina con i recettori di acido sialico presenti sulle membrane delle cellule animali. La HA neo-sintetizzata, chiamata HA0, non è in grado di effettuare tale legame: deve subire un *cleavage* da parte di proteasi dell'ospite che la scompongano nei segmenti HA1 e HA2. Ogni monomero della HA consiste in una lunga catena elicoidale ancorata alla membrana dall'estremità HA2 e sovrastata da una parte globulare costituita dall'estremità HA1. L'estremità del segmento HA1 è quella in grado di effettuare il legame con l'acido sialico presente sui recettori delle cellule epiteliali dell'ospite. Essendo il principale antigene di superficie la composizione aminoacidica di questa proteina è molto variabile, in risposta alla pressione esercitata dal sistema immunitario dell'ospite. In natura infatti sono presenti 16 varianti di questa proteina (H1, H2, H3.....H16), che permettono di distinguere all'interno dei virus influenzali di tipo A diversi subtipi. All'interno di ciascun subtipo possono essere presenti svariati ceppi varianti parzialmente cross reattivi (Webster R.G. et al, 1992).

La NA o neuramminidasi è, come la emoagglutinina, una glicoproteina di membrana e il secondo antigene di superficie, valgono pertanto le affermazioni fatte per la HA rispetto alla pressione immunitaria dell'ospite e alla comparsa di varianti: sono presenti 9 subtipi di NA, (N1, N2... N9), sierologicamente non cross reattivi. Tale proteina ha la funzione di distruggere i recettori cellulari e "liberare" i virus neoformati dalla cellula ospite, permetterne la diffusione e favorire l'infezione di cellule epiteliali adiacenti.

M1 è una proteina della matrice che avvolge il nucleocapside, al di sotto dell'envelope. E' la proteina più abbondante del virione.

La nomenclatura dei virus influenzali è standard e segue un sistema comune proposto dalla Organizzazione Mondiale della Sanità nel 1971, e successivamente rivisto nel 1980 (WHO *Export Committee* 1971 e 1980). Per caratterizzare uno specifico virus influenzale è necessario indicare il tipo, la specie ospite, la nazione di isolamento, il numero di serie e l'anno di isolamento. Tra parentesi si indicano i sottipi HA e NA. L'esempio di una nomenclatura corretta è : A/ chicken/ Pakistan/ 447/ 95 (H7N3).

Il ciclo virale inizia a seguito della fusione dell'envelope alla membrana cellulare mediata dal legame della proteina HA con i recettori presenti sulla membrana delle cellule epiteliali dell'ospite. Le particelle virali infettanti vengono poi internalizzate nella cellula per endocitosi e, grazie all'azione di pompa protonica esercitata dalla proteina M2, viene mantenuto all'interno della vescicola endocitotica un valore di pH tale da garantire il cambiamento conformazionale delle proteine HA e M1 che, una volta attivate, mediano la fusione completa dell'envelope con la membrana della vescicola con conseguente liberazione del nucleocapside nel citoplasma. Da qui viene trasferito al nucleo dove inizia la sintesi dell'mRNA virale a partire da un primer costituito da RNA cellulare e la sintesi di vRNA. Gli mRNA neotrascritti vengono poi tradotti in proteine: le glicoproteine di superficie HA e NA vengono processate nel reticolo endoplasmatico e nel Golgi, le restanti nel citoplasma. L'emoagglutinina e la neuramminidasi vengono quindi trasportate verso la superficie cellulare e si inseriscono nel doppio strato lipidico della membrana. I nuovi segmenti di vRNA a polarità negativa si uniscono alle proteine NP, PB1, PB2 e PA e vanno a costituire i nucleocapsidi elicoidali che si associano con la proteina M1 che delimita le zone di membrana contenenti le proteine HA, NA, M2. Queste zone di membrana sono quelle che andranno a costituire l'envelope virale. I singoli virioni vengono rilasciati completi di envelope per gemmazione. Il passaggio finale della maturazione del virus è rappresentato dal cleavage dell'HA0 nei segmenti

HA1 e HA2 ad opera delle proteasi dell'ospite.

Si suppone che negli uccelli, nei quali il virus riconosce un ciclo oro-fecale, il cleavage si verifichi all'interno dell'ospite, in particolare a livello dell'epitelio intestinale; nei mammiferi d'altro canto, in cui l'infezione è prettamente respiratoria, il cleavage è realizzato da proteasi presenti nel tratto respiratorio (Webster *et al.*, 1992).

Quanto più un virione è sensibile all'attivazione della HA0 da parte di proteasi presenti in diversi tessuti tanto maggiore è il suo potenziale patogeno.

L'adesione alla cellula ospite dipende dall'interazione tra il sito di legame del recettore presente sulla testa dell'emoagglutinina attivata, in particolare l'estremità libera del segmento HA1, e il recettore stesso, esposto sulla membrana plasmatica delle cellule epiteliali dell'ospite. La realizzazione dell'interazione HA1-recettore dipende dall'affinità dell'HA per il tipo di sialigooligosaccaride presente a livello del sito recettoriale, in particolare l'affinità nel legame sembra essere determinata dal tipo di legame glicosidico presente tra l'acido sialico terminale e il galattosio che lo precede. I ceppi aviari presentano una maggiore affinità per recettori che espongono una molecola di acido sialico legata al galattosio mediante un legame glicosidico di tipo α 2,3, che per l'appunto sono tipicamente presenti sulle cellule epiteliali intestinali delle specie aviari, mentre ceppi umani mostrano una maggiore affinità per il legame glicosidico di tipo α 2,6 che invece è tipico dei recettori presenti sulle cellule epiteliali del tratto respiratorio dell'uomo (Harder e Werner, 2006). Tale affinità che determina una certa specificità di legame è alla base della specie specificità dimostrata dai virus influenzali.

I virus influenzali sono divisi in due gruppi: virus ad alta (HPAIV) e a bassa patogenicità (LPAIV) in relazione ai segni clinici che determinano nell'ospite. Tutti i 16 subtipi HA, esclusa una piccola percentuale di virus con subtipo H5 e H7 (Swayne e Suarez, 2000), non sono ad alta patogenicità. Generalmente gli H5 e H7 sono mantenuti all'interno delle popolazioni selvatiche nella forma a bassa

patogenicità.

Tutti i ceppi isolati H5 e H7 altamente patogeni presentano una caratteristica comune: la presenza di più aminoacidi basici, come l'arginina o la lisina, in corrispondenza del sito di cleavage dell'emoagglutinina HA0 (OIE Manual, 2005). Pertanto una semplice mutazione a livello della sequenza genomica che codifica per gli aminoacidi presenti sul sito di cleavage, può conferire ad un ceppo a bassa patogenicità il carattere di alta patogenicità, che si traduce all'interno dell'ospite in una replicazione sistemica facilitata. I ceppi a bassa patogenicità infatti sono suscettibili al cleavage da parte di proteasi presenti in pochi tipi cellulari (spesso l'epitelio intestinale degli uccelli acquatici), mentre i virus altamente patogeni sono suscettibili al cleavage da parte di proteasi presenti in un' ampia varietà di tessuti (Wobeser, 1997).

Per tutti i virus aviari a bassa patogenicità nei polli, la sequenza aminoacidica del sito di cleavage dell'HA0 deve essere determinata e se risulta simile alla sequenza osservata nei ceppi HPAI, il virus esaminato viene considerato altamente patogeno.

2.1.2 Il virus influenzale nei mammiferi

Nel cavallo i subtipi isolati sono l'H3N8 e l'H7N7. Entrambi causano la comparsa di segni clinici respiratori quali tosse secca e tracheobronchite, con la presenza di dolori muscolari e febbre. L'infezione da H7N7 sembra avere una gravità clinica maggiore rispetto all'infezione da H3N8 (Beveridge, 1965). Studi di filogenesi hanno evidenziato che i virus furono introdotti nel cavallo dagli uccelli molto tempo fa e che si sono mantenuti all'interno di questo ospite senza evolversi in maniera significativa (Kawaoka *et al.*, 1989).

Considerando questo fatto si è attribuito al cavallo un ruolo di fondo cieco epidemiologico (Webster *et al.*, 1992).

Anche il visone risultò suscettibile al virus influenzale, sia dopo contagio per via naturale che per via sperimentale (Klingerbone *et al.*, 1985); il virus isolato

nell'infezione naturale fu un H10N4 di origine aviaria.

Nel 1979 e 1980 la popolazione di foche della costa nordest degli Stati Uniti fu decimata in seguito ad una patologia respiratoria caratterizzata da un quadro di consolidamento polmonare, tipico delle polmoniti virali primitive. L'esame anatomico-patologico e microbiologico di campioni di polmone e cervello prelevati dagli animali morti rivelò la presenza di virus influenzali nei tessuti. In particolare venne isolato un H7N7 (Geraci *et al.*, 1982), e da foche rivenute morte tre anni dopo sulle medesime coste degli Stati Uniti fu isolato un H4N5, caratterizzato da una mortalità più bassa rispetto al ceppo precedente (Hinshaw *et al.*, 1984). Entrambi i virus si rivelarono essere di derivazione aviaria e questo fornì la prova concreta che un virus di origine aviaria può infettare i mammiferi, adattarsi al nuovo ospite e produrre segni clinici molto gravi (Webster *et al.*, 1992).

Lo stesso si verificò con le balene, dai cui polmoni, linfonodi e fegato vennero isolati altri virus influenzali, principalmente H13N2 e H13N9, entrambi di origine aviaria (Hinshaw *et al.*, 1986).

Nel suino sono stati isolati essenzialmente due sottotipi virali, entrambi di derivazione aviaria: H1N1 e H3N2, per i quali questo animale funge essenzialmente da reservoir (Webster *et al.*, 1992). I segni clinici associati all'infezione sono molto simili a quelli dell'uomo e includono congiuntivite, scolo nasale e febbre. Altri sottotipi di origine aviaria ritrovati nel suino sono H1N7 e H4N6 (Brown *et al.*, 1997). Nelle popolazioni di suini dell'est della Cina, infine, è moderatamente presente un H9N2 di provenienza aviaria (Xu *et al.*, 2004).

Più di recente, nel 2004, in uno zoo della Thailandia un H5N1 ha causato la malattia e la morte in alcune tigri e altri grossi felini che erano stati alimentati con carcasse di pollame infette, fornendo la prima prova della suscettibilità dei felini all'infezione con virus aviari (Keawcharoen, 2004; Quirk, 2004; Amosin, 2005).

All'infezione sperimentale con H5N1 sono risultati sensibili anche furetto e scimmie; il furetto è stato utilizzato come modello per lo studio del comportamento dell'H5N1 nei mammiferi (Zitzow e Govorkova, 2005).

Da quanto esposto sopra emerge chiaramente come i virus influenzali che infettano le diverse specie riconoscano una comune origine: i virus aviari.

2.1.3 Il ruolo del suino come “mixing vessel”

Il suino è suscettibile alla duplice infezione con virus di origine aviare e di origine umana e ciò è confermato dal fatto che le sue cellule epiteliali possiedono a livello del recettore legami glicosidici misti (_ 2,3 e _ 2,6) (Harder e Werner, 2006). Questa evidenza biochimica supporta la teoria che considera il suino un sito di ricombinazione tra virus umani e virus aviari, in cui, successivamente ad una doppia e contemporanea infezione, si assiste alla comparsa di un ceppo nuovo con genoma misto, con caratteristiche antigeniche sconosciute al sistema immunitario, infettivo per l'uomo ed in grado di trasmettersi da uomo a uomo. Un virus così originato potrebbe essere causa di una pandemia tra la popolazione umana. L'ipotesi è supportata anche da una semplice considerazione epidemiologica: il suino è un animale che per la modalità di allevamento e per le zone di stabulazione, in realtà non industriali, - quali ad esempio i Paesi del Sud Est Asiatico - ha molta probabilità di contatti frequenti sia con gli uccelli che con l'uomo.

2.1.4 Ecologia del virus negli uccelli domestici d'allevamento

Se un virus veicolato da uccelli selvatici entra in contatto con uccelli domestici le forme cliniche che ne risultano sono variabili a seconda che il ceppo introdotto sia un LPAI o un HPAI virus. Nel caso si diffonda un LPAI virus all'interno di un allevamento avicolo, gli animali presentano un quadro sintomatologico aspecifico, caratterizzato da sintomi respiratori ed enterici spesso associati, nei riproduttori e nelle ovaiole commerciali, ad anomalie riproduttive (calo o arresto della deposizione, alterazioni dell'uovo).

Ci sono comunque LPAI virus che si sono adattati in maniera efficiente alla replicazione all'interno del pollame allevato, come alcuni ceppi dell'Asian H9N2, che sono in grado di causare segni clinici gravi e percentuali significative di mortalità (Bano *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). Nelle forme sostenute da virus altamente patogeni si viene ad instaurare un quadro clinico grave, con una mortalità che raggiunge il 100% in 48 ore (Swayne e Suarez, 2000). Gli individui colpiti nella maggior parte dei casi manifestano severa apatia e immobilità, in maniera irregolare compaiono edema visibile a livello del capo, cianosi di cresta e bargigli, diarrea verdastra e respiro affannoso. Possono essere presenti quadri caratterizzati da una sintomatologia neurologica con tremori, posture anomale, atassia, andatura in circolo, ma sembrano più tipici dell'infezione in specie meno vulnerabili da HPAI virus, quali oche e anatre (Kwon *et al.*, 2005).

Quasi mai il virus è introdotto nell'allevamento come virus ad alta patogenicità, bensì è frequente che venga introdotto un ceppo a bassa patogenicità, che passi inosservato e che, nell'arco di pochi mesi, circolando all'interno della popolazione, muti ad una forma ad alta patogenicità.

2.1.5 I virus influenzali nell'uomo

Nel corso del XX secolo l'uomo dovette affrontare tre grosse epidemie influenzali: la Spagnola nel 1918, l'Asiatica nel 1957 e la Hong Kong nel 1968; di minore importanza in termini epidemiologici fu la Russa del 1977 o pandemia dei giovani. Le tre epidemie mostrano una chiara irregolarità per quanto riguarda l'intervallo di tempo di comparsa, e differenze notevoli in termini di severità della patologia e mortalità. La pandemia del 1918 o "spagnola" fu sostenuta da un H1N1 e la diffusione a livello mondiale dell'epidemia avvenne nel corso di tre ondate, in un intervallo di tempo compreso tra la primavera del 1918 e i primi mesi del 1919. Si stima che il numero delle persone infettate corrisponda a circa un terzo della popolazione mondiale di quel tempo - 500 milioni di persone - e che l'ammontare

dei morti si aggiri attorno ai 50 milioni, probabilmente sottostimati. Una stima effettiva infatti potrebbe portare a 100 milioni il numero totale delle vittime del virus (Johnson e Mueller, 2002).

La pandemia originò in Kansas, negli Stati Uniti, all'interno di un campo militare e successivamente si diffuse con estrema rapidità in Europa e Asia.

Il virus oltre a diffondersi con una rapidità notevole, fu in grado di provocare la comparsa di quadri clinici gravissimi caratterizzati da sintomatologia respiratoria che raramente esitarono in guarigione. In realtà, esami anatomo-patologici eseguiti sui cadaveri rivelarono che le gravi forme polmonari, di cui si riteneva essere responsabile il solo virus, furono il risultato di infezioni batteriche secondarie che interessarono gli ammalati (Kilbourne, 1960). Nel 1957 il mondo venne investito da un'altra ondata influenzale sostenuta da un H2N2, la cosiddetta "Influenza Asiatica". Un articolo del New York Times dell'aprile 1957 rivela che ad Hong Kong ci furono 250mila morti. Il virus dimostrò subito di essere in grado di uccidere e causare gravi forme cliniche caratterizzate da consolidamento ed edema polmonare anche in assenza di infezioni batteriche secondarie (Kilbourne, 2006).

Sempre in Cina, nel 1968, ebbe origine un'altra pandemia: la "Hong Kong". L'agente eziologico responsabile fu un H3N2. Dalla Cina si diffuse a Giappone, costa ovest degli Stati Uniti, Europa. Il tipo di malattia e la gravità dei sintomi furono molto differenziati a seconda della zona geografica: in Giappone infatti ci furono episodi di epidemie piccole, disseminate e saltuarie, al contrario negli Stati Uniti occidentali l'ingresso del virus risultò in un alto tasso di malattia e morte (Kilbourne, 2006).

Il mondo non era del tutto nuovo al virus in questione: differiva infatti dal virus responsabile dell'Asiatica circolato 10 anni prima solo per l'antigene di superficie HA, la NA era la stessa, N2. Ciò ha condotto alcuni ricercatori a credere che la differente risposta al virus delle popolazioni dei diversi paesi fosse funzione del grado di circolazione dell' H2N2 e quindi del livello di protezione immunitaria presente (Stuart- Harris, 1979).

Infine, nel 1977, comparve la “Russa” o influenza rossa causata nuovamente da un H1N1. Il primo allarme di malattia si ebbe in Russia nell’ottobre del 1977 ma questo si rivelò poi essere stato preceduto da focolai nel maggio dello stesso anno in Cina (Beveridge, 1978). All’interno della popolazione gli unici colpiti dal virus furono i ragazzi giovani al di sotto dei 25 anni di età, il che fu attribuito al fatto che il virus era sconosciuto per il loro sistema immunitario, mentre persone più anziane si ritiene avessero già incontrato l’H1N1 durante la pandemia del ’18 o negli anni successivi poiché si suppone che il virus sia rimasto circolante all’interno della popolazione, anche grazie ad una sua persistenza enzootica nel maiale, almeno fino al 1956 quando fu rimpiazzato dall’H2N2 (Taubenberger e Morens, 2006).

Ma da dove originarono questi virus influenzali sconosciuti all’uomo e tanto devastanti?

Studi recenti sul virus responsabile della Spagnola hanno evidenziato la presenza, all’interno del genoma virale, di geni di origine aviaria codificanti per le proteine di superficie (Reid *et al.*, 1999) ma sembra che il genoma completo si sia evoluto all’interno di un ospite sconosciuto (Reid *et al.*, 2004); ovvero il virus possiede un’origine aviaria ma deve essersi evoluto separatamente da un punto di vista filogenetico, e non è ben chiaro in quale reservoir si sia verificata tale evoluzione. Il virus comunque era strettamente correlato con un ceppo virale che infetta il suino (Webster e Walker, 2003) e circolante da lungo tempo nelle popolazioni di suini dell’epoca. Molto più semplice è invece l’origine dell’H2N2 del 1957 e dell’ H3N2 del 1968: entrambi furono il risultato di eventi di ricombinazione tra il vecchio H1N1 e virus circolanti all’interno delle popolazioni aviari. In questo senso il virus del ’18 può essere considerato come “la madre” delle successive pandemie influenzali.

Il virus che provocò la cosiddetta influenza rossa nel ’77 era lo stesso del ’18 che si suppone riemerse all’improvviso a causa di una “fuga” da freezer di un laboratorio (Kendal *et al.*, 1978) . Da quanto esposto emergono due considerazioni: in primo luogo si evince che l’ampio spettro di virus influenzali albergati dagli uccelli

rappresenta una fonte pericolosa di ricombinazioni che possono condurre alla comparsa di ceppi nuovi, altamente patogeni e potenzialmente capaci di pandemie umane.

In secondo luogo, focalizzando l'attenzione sulla localizzazione geografica delle pandemie, si nota che tutte, ad eccezione della Spagnola, iniziarono in Cina. Il che ha fatto pensare che la Cina funga da epicentro per i virus influenzali (Webster, 1992).

2.1.6 Ecologia del virus influenzale negli uccelli acquatici

Gli uccelli acquatici selvatici sono considerati il reservoir naturale dei virus influenzali, intendendo come reservoir l'ospite che mantiene l'infezione e, di solito, non contrae la malattia, la contrae solo in forma lieve, o la stessa si manifesta solo in animali giovani, mentre gli adulti sono immuni o infetti a livello sub-clinico. Mentre in tutte le specie di mammiferi suscettibili e negli uccelli domestici, il virus influenzale mostra un tropismo per l'apparato respiratorio, negli uccelli selvatici il virus si localizza a livello dell'apparato gastroenterico, in particolare nelle cellule epiteliali dell'intestino e generalmente l'infezione è asintomatica, tranne pochi casi di infezione da parte di rari ceppi altamente patogeni in grado di produrre una infezione sistemica con coinvolgimento anche del sistema nervoso centrale e morte in una settimana.

Nel primo caso, in seguito all'infezione asintomatica con un virus a bassa patogenicità (LPAIV), gli animali producono una reazione anticorpale di entità tale da impedire lo sviluppo di segni clinici e la reinfezione con lo stesso ceppo, ma non da impedire un'infezione contemporanea con un ceppo diverso: questo permette al reservoir non solo di ospitare virus, renderne possibile la replicazione e la dispersione nell'ambiente, ma offre l'opportunità allo stesso di fungere da sito di ricombinazione tra virus diversi (Sharp *et al.*, 1997). Uccelli sani si possono infettare mediante il contatto con animali che albergano il virus o semplicemente

mediante il contatto con acque contaminate. Questa ipotesi è suffragata dal fatto che i virus hanno dimostrato di avere una resistenza notevole nelle acque, inversamente proporzionale alla temperatura. Un LPAI virus può rimanere infettante 4 giorni in acque di lago a 22° C ma aumentare la sua resistenza fino ad un periodo di 30 giorni ad una temperatura delle acque pari a 0° C (Webster *et al.*, 1978).

L'eliminazione di nuove particelle virali infettanti avviene mediante la via fecale; è stato stimato che una singola anatra infetta possa eliminare una quantità di virus pari a circa 10¹⁰ EID per un periodo di tempo variabile tra i 6-7 giorni e i 14-21 giorni (Webster *et al.*, 1978).

I virus influenzali si sono adattati nel corso del tempo alle specie serbatoio andando verso una completa attenuazione della patogenicità nell'ospite anseriforme. Questi uccelli consentono la permanenza in natura dei soli virus a bassa patogenicità. I virus aviari infatti non hanno cambiato significativamente la loro costituzione antigenica negli ultimi 60 anni, a differenza di quanto è avvenuto per i ceppi responsabili di infezione nell'uomo e negli altri mammiferi che hanno subito variazioni notevoli nello stesso arco di tempo.

L'infezione di uccelli acquatici con virus ad alta patogenicità (HPAIV) è un evento raro: in passato sono state registrate solo due consistenti morie provocate da virus altamente patogeni.

Il primo isolamento di un HPAIV risale al 1961, quando in Sudafrica un H5N3 causò la morte di almeno 1300 sterne (Alexander, 2000); e più recentemente nella primavera del 2005, in Cina, nel lago Quinghai, un H5N1 ha causato la morte di oltre 6000 uccelli migratori, tra cui Oche indiane, Gabbiani del Pallas, Gabbiani testabruna (Liu *et al.*, 2005). I focolai sostenuti da virus ad alta patogenicità negli uccelli selvatici sono molto rari in natura in quanto non rappresentano una strategia ecologica vincente: per lo stesso virus risulta poco conveniente uccidere il serbatoio attraverso il quale si moltiplica e si diffonde.

Come già sottolineato in merito alla classificazione dei virus influenzali in ceppi altamente e scarsamente patogeni i virus sono definiti altamente o scarsamente

patogeni in relazione alle conseguenze dell'infezione sperimentale del pollame (*Gallus gallus*); HPAI virus in grado di determinare in una popolazione di uccelli domestici gravi segni clinici ed elevate percentuali di mortalità, se circolanti tra gli individui di una popolazione appartenete al genere Anatidae generalmente causano un'infezione asintomatica, risultante in gran quantità di virus escreto in assenza di segni clinici.

Gli episodi sopraccitati di morie tra gli uccelli selvatici determinate dall'infezione con un HPAI virus rappresentano un cambiamento dell'ecologia del virus che verrà considerato successivamente in relazione all'attuale emergenza dell' H5N1. Da queste considerazioni emerge chiaramente come gli uccelli acquatici rappresentino un ideale serbatoio per il virus, in cui questo replica senza provocare danni all'ospite, viene eliminato in maniera efficace e diffuso spazialmente su larga scala grazie all'ecologia di questi animali che effettuano migrazioni ad ampio raggio e che hanno abitudini gregarie . Le zone umide, che fungono da centri di congregazione di specie diverse, rappresentano aree in cui si raggiungono densità notevoli di animali e conseguentemente potenziali alti livelli di inquinamento delle acque.

LPAI virus sono stati isolati almeno da 105 specie di uccelli selvatici appartenenti a 26 famiglie differenti (Olsen *et al.*, 2006), ma è stata dimostrata una netta prevalenza dell'infezione all'interno di due famiglie di uccelli acquatici: la famiglia degli Anseriformi (*Anatidae*) che comprende anatre, oche e cigni e la famiglia dei Charadriiformi (*Charadriidae*) che comprende pivieri, gabbiani, trampolieri, sterne.

Dalle anatre sono stati isolati praticamente tutti i sub-tipi virali ad eccezione degli H13, H14, H15, H16 che invece sono di frequente ritrovamento nei gabbiani. I sub-tipi più frequentemente isolati fino ad oggi sono H3, H4 ed H6; gli H1, H2, H7, H10 e H11 meno frequentemente; H5, H8, H9, H12, infine, solo sporadicamente (Olsen *et al.*, 2006).

Ciò che emerge dai campionamenti è la presenza di una netta prevalenza dell'infezione tra i giovani, e da un punto di vista spazio temporale il picco di

isolamenti risulta verificarsi verso la fine dell'estate e inizio dell'autunno, in corrispondenza cioè della migrazione di ritorno verso le aree di svernamento; minori percentuali di positivi invece si ritrovano in inverno, praticamente nulli all'inizio della primavera.

Il picco di isolamenti sopradescritto coincide con il momento in cui gli uccelli si radunano nelle aree umide delle zone di riproduzione in attesa di iniziare la migrazione verso sud dove si trovano le zone di svernamento. La presenza di moltissimi uccelli, soprattutto giovani, favorisce la co-infezione degli individui con vari ceppi di virus influenzali che potranno colonizzare successivamente le aree di svernamento. La circolazione di LPAI nelle popolazioni di anatre è risultata essere funzione di diversi parametri. Un fattore importante è la percentuale di giovani nella popolazione: quanto maggiore sono i giovani presenti quell'anno tanto maggiore risulta essere la circolazione dei virus (Sharp *et al.*, 1993); sembra esserci inoltre una prevalenza variabile di certi sub-tipi su altri in relazione all'anno di campionamento e in relazione alla rotta migratoria, il che suggerisce una distribuzione spazio temporale dell'incidenza dei differenti sierotipi (Olsen *et al.*, 2006).

Nei gabbiani i principali sub-tipi isolati sono H13 e H16, in una piccola percentuale di animali, con caratteristiche simili a quanto osservato per le anatre: prevalenza nei giovani e nel periodo tra la fine dell'estate e l'inizio dell'autunno. I virus isolati sembrano evolutivamente distinti dai virus comunemente isolati nelle anatre, pertanto ciò che si suppone è che vengano mantenuti all'interno della popolazione di gabbiani e all'interno di questo ospite si siano evoluti in modo indipendente rispetto ai sub-tipi H1-H12 comunemente isolati dalle anatre (Fouchier *et al.*, 2005). Tale evidenza genetica è suffragata dal fatto che sperimentalmente gli H13 e gli H16 non sono in grado di infettare le anatre (Webster *et al.*, 1992).

Nei trampolieri si verifica un'inversione di quanto visto sinora per quanto riguarda il periodo di maggior prevalenza degli LPAI virus, infatti i maggiori isolamenti sono relativi al periodo della migrazione estiva (Krauss *et al.*, 2004) e i sub-tipi

isolati vanno dall' H1 all' H12, come per le anatre, ma sembra che questi uccelli di fatto mantengano un più ampio spettro di sub-tipi. Il fatto che ci sia una corrispondenza genetica tra i virus isolati dalle anatre e quelli dei trampolieri, suggerisce per questi ultimi il ruolo di serbatoi e veicoli del virus verso nord, nelle zone di riproduzione delle anatre (Krauss *et al.*, 2004).

2.1.7 *Altri uccelli selvatici*

LPAI virus sono stati isolati anche da altri gruppi, come i columbiformi (piccioni, colombe, tortore), i turdidi (merli, cesene), i rundinidi (rondini), gli sturnidi (storni) e i passeriformi che sembrano però poco recettivi o addirittura resistenti. I rapaci sono sensibili ma non costituiscono un serbatoio importante. Tuttavia non essendoci studi sufficientemente approfonditi riguardo alla loro distribuzione, il ruolo di queste specie nel mantenimento e nell'evoluzione dei LPAI virus è pressoché sconosciuto.

2.1.8 *Mantenimento del virus nelle popolazioni selvatiche*

Tutti i diversi sub-tipi dei virus influenzali sono mantenuti all'interno delle popolazioni selvatiche acquatiche. Dato che un uccello infettato da un LPAIV alberga nel suo organismo ed elimina il virus per un periodo medio di 2 settimane e dopo questo periodo non è più suscettibile all'infezione ci si è chiesti come possano tutte le varianti essere mantenute costantemente circolanti. Sono state proposte diverse teorie. La prima teoria ipotizza una continua circolazione dei diversi sub-tipi virali all'interno della popolazione, garantita dalla presenza ogni primavera di giovani suscettibili all'infezione con sub-tipi che durante la stagione invernale circolino a livelli molto bassi mentre gli uccelli svernano nelle regioni temperate e subtropicali.

La seconda teoria, invece, è a favore di una circolazione interspecifica del virus, in

particolare tra trampolieri e pivieri da un lato e anatre dall'altro. Questo è supportato da quanto esposto sopra in relazione ai diversi periodi di massimo isolamento del virus nelle diverse specie.

Un'altra teoria affida all'ambiente il ruolo principale nel mantenimento del virus: la resistenza ambientale dei virus influenzali, che risulta essere inversamente proporzionale alla temperatura, supporta l'ipotesi che i virus vengano mantenuti all'interno degli specchi d'acqua dove si radunano gli uccelli durante la stagione di riproduzione, soprattutto in inverno quando gli animali non sono presenti, quando è stata dimostrata esserci una scarsa circolazione virale, e le acque sono congelate. Il valore di tale teoria è stato confermato da dati ricavati da ricercatori nel 1995 e nel 2000 che dimostrarono la persistenza di virus infettanti all'interno delle acque ghiacciate delle regioni artiche durante l'inverno, in assenza dei loro ospiti abituali. Pertanto si dimostrò che queste acque potevano fornire nella stagione riproduttiva successiva, quando gli uccelli tornavano a ripopolarle, una fonte di virus a disposizione per adulti e prole (Harder e Werner, 2006).

Un quarta teoria, non supportata però da evidenze molecolari, ipotizza una persistenza del virus all'interno dell'individuo infettato oltre il periodo di 15 giorni. Secondo i sostenitori di tale teoria il genoma virale potrebbe venire incorporato nel DNA dell'ospite o in forma episomale. L'ultima ipotesi è che i virus siano continuamente presenti nelle regioni tropicali e che gli uccelli che vi svernano si infettino e li portino nelle regioni più a nord con la migrazione primaverile.

2.2 IL VIRUS INFLUENZALE AD ALTA PATOGENICITÀ H5N1

Fino alla fine del 2003 la circolazione di virus aviari ad alta patogenicità tra il pollame era considerata un evento raro. Infatti nell'arco di tempo compreso tra il 1959 e il dicembre del 2003 si verificarono solamente 24 episodi di focolai primari in tutto il mondo, la maggior parte dei quali in Europa e America, sostenuti da diversi virus appartenenti a subtipi H5 o H7. Tutti gli episodi comunque furono geograficamente limitati e non raggiunsero mai l'entità del focolaio asiatico di fine 2003 - inizio 2004.

L'improvviso aumento dell'incidenza di episodi di influenza sostenuti da HPAIV, si verificò in Cina e altri paesi dell'est dell'Asia tra il dicembre del 2003 e gennaio 2004, quando un H5N1, in particolare l'A/chicken/East Asia/2003-2005 colpì un totale di otto paesi nell'arco di tempo di tre mesi: Cina, Giappone, Sud Corea, Vietnam, Laos, Cambogia, Thailandia, e Indonesia, e nell'agosto 2004 il numero aumentò a nove; lo stesso virus si dimostrò fatale per l'uomo mietendo vittime in Vietnam e Thailandia.

Data la velocità con cui i focolai apparivano nei diversi paesi subito risultò subito eccezionale la capacità di diffusione, in termini di rapidità e di distanza; infatti nei mesi successivi apparve evidente che i focolai costituivano una prima tappa nella distribuzione del virus, seguita poi da altre due ondate o fasi di distribuzione ad ampio raggio.

Nonostante ci fossero evidenze antecedenti relative alla circolazione in Asia di H5N1, si può affermare con certezza che questo abbia circolato nella regione già a partire dal 1996, da quando cioè venne rilevata la prima infezione nelle oche nel Guangdong, una provincia della Cina. La patologia comparve in un secondo momento ad Hong Kong nel 1997, sostenuta dall'A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) che infettò e decimò il pollame in vendita nei mercati e si trasmise all'uomo, causando l'infezione di 18 persone e la morte di 6. Dal 1999 in poi la circolazione

del virus tra le specie aviarie venne regolarmente monitorata e confermata mediante prelievi di sangue, tamponi cloacali, materiale fecale prelevato dalle gabbie. I campionamenti rivelarono un aumento degli isolamenti virali nel periodo di tempo compreso tra il 1999 e il 2001. Verso la fine del 2000 si ritiene che il virus abbia esteso il suo spettro d'ospite, includendo le anatre domestiche, il che fu un fattore chiave nella genesi degli eventi del 2003-2004, poiché questo favorì la diffusione dell'infezione su larga scala (Sims *et al.*, 2005). Le anatre domestiche infatti, in virtù della differente ecologia del virus all'interno di queste ultime rispetto all'ospite pollo, rappresentarono un'ottima via di trasmissione del virus ad altro pollame e all'uomo stesso, e la loro capacità di trasmettere l'infezione andò migliorando nel corso degli anni. Studi di laboratorio infatti dimostrarono che anatre domestiche infettate con H5N1 circolanti nel 2004, rispetto ad altre infettate con virus circolanti nel 2003, erano in grado di eliminare il virus più a lungo e in dosi maggiori, e per lo più in assenza di segni clinici evidenti. Lo stesso studio evidenziò come un'anatra apparentemente sana potesse eliminare la stessa quantità di virus eliminata da un pollo visibilmente malato (WHO, 2004).

Tali evidenze hanno fatto supporre che le anatre domestiche abbiano giocato un ruolo fondamentale nel mantenimento e nella diffusione di un virus letale per il pollame e innocuo per loro, considerato l'allevamento misto delle due specie nelle regioni asiatiche e l'immensa possibilità di contatti nei mercati di animali (WHO, 2004).

A partire dal 2003 il virus divenne endemico nella popolazione di uccelli domestici del Sud Est Asiatico distribuendosi successivamente, seguendo tre grandi ondate di diffusione, al resto del mondo.

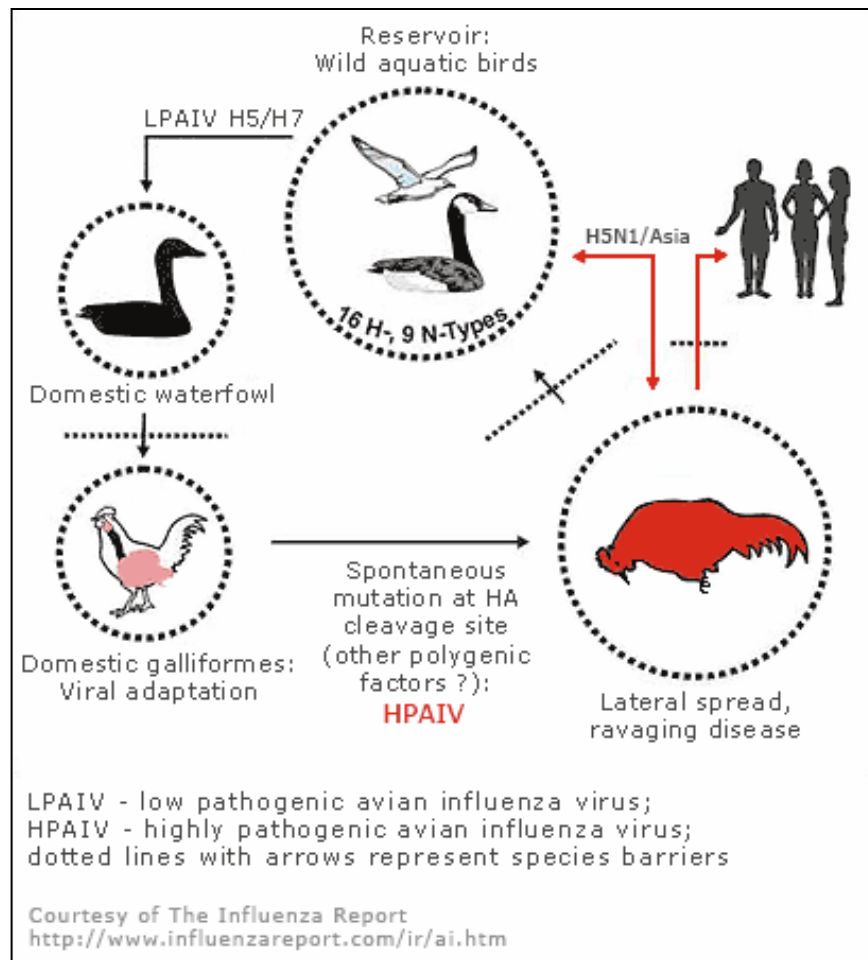


Fig. 2 - Origine dei virus HPAI e ruolo delle specie selvatiche.

Fonte: <http://www.influenzareport.com>

2.2.1 La diffusione mondiale del virus

La diffusione mondiale dell' H5N1 si è realizzata in tre grosse ondate.

La prima ondata si verificò nel periodo compreso tra dicembre 2003 e marzo 2004 e furono interessati nell'ordine otto paesi asiatici quali Corea, Vietnam, Giappone, Thailandia Cambogia, Laos, Indonesia e Cina (WHO, Timeline 2006). In quattro mesi più di 120 milioni di uccelli morirono o vennero soppressi, creando uno scenario in termini di mortalità e perdite economiche maggiore di quanto fosse successo in tutte le precedenti epidemie registrate nelle precedenti quattro decenni (WHO, 2005). Ci fu poi una seconda fase tra giugno/luglio 2004 e novembre 2004. Tra giugno e luglio Cina, Indonesia, Thailandia e Vietnam riferirono della ricomparsa del virus H5N1 nei polli. A fine luglio il Giappone viene dichiarato dall'OIE indenne all'H5N1 e poco dopo, i primi di agosto, la Malesia denunciò i primi casi di malattia nei volatili. Nel settembre dello stesso anno anche la Corea venne dichiarata esente dal virus. Comparirono casi umani in Vietnam e in Thailandia, alla fine della seconda ondata si verificarono nove casi umani di cui otto fatali.

La terza fase che comprende tutto il 2005 fino ad oggi, ha visto la diffusione mondiale del virus che, pur diffondendosi con una rapidità unica, nelle prime due ondate era rimasto confinato al continente asiatico.

Il virus a partire dal marzo del 2005, fino al maggio 2006 è giunto in Europa ed Africa del Nord, colpendo nell'ordine gli uccelli domestici di Kazakistan, Russia, Turchia, Romania, Ucraina, Croazia, Iraq, Nigeria, Azerbaigian, Bulgaria, Grecia, Italia, Iran, Austria, Germania, Egitto, India, Francia, Ungheria, Slovacchia, Bosnia-Erzegovina, Niger, Svezia, Svizzera, Serbia-Montenegro, Polonia, Albania, Camerun, Myanmar, Danimarca, Afghanistan, Israele, Pakistan, Giordania, Repubblica Ceca, Burkina-Faso, Regno Unito Sudan, Costa d' Avorio (WHO, Timeline 2006). In questi paesi il virus è stato isolato tanto da pollame allevato come da uccelli selvatici trovati morti.

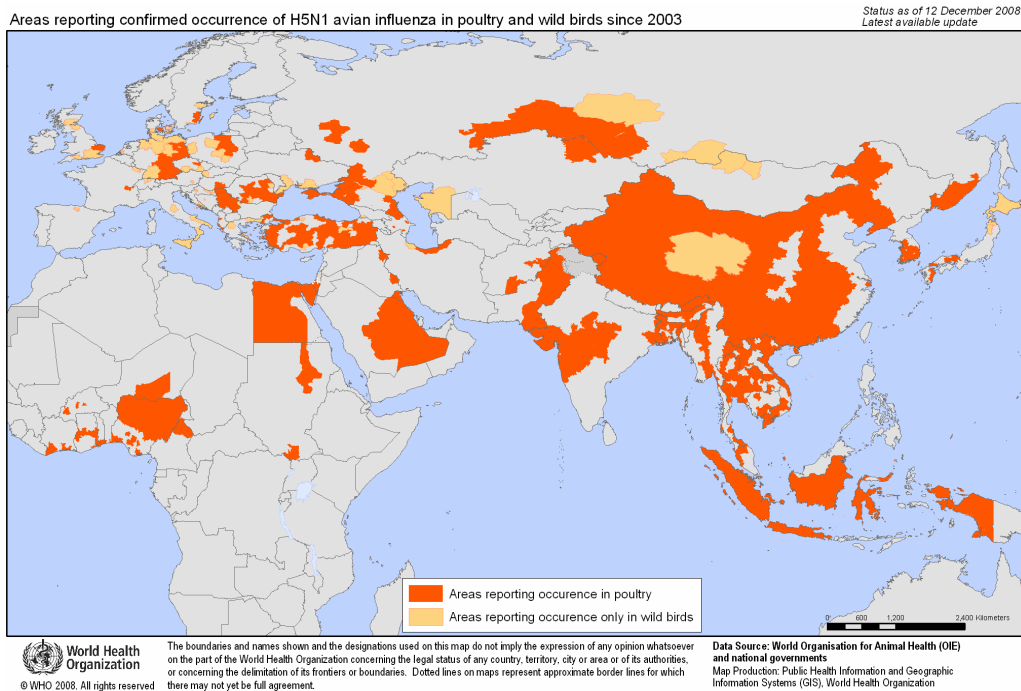


Fig. 3 - Aree in cui sono stati confermati focolai da HPAI H5N1 nel pollame domestico ed in volatili selvatici dal 2003 al 2008 (Fonte: WHO, 2008)

2.2.2 *L'origine genetica del virus*

L' H5N1 responsabile dei focolai nel Sud Est Asiatico si ritiene abbia circolato nel Sud della Cina già dal 1997 e che il suo precursore fosse l' A/Goose/Guangdong/1/96, ma solo a partire da fine 2003 – inizio 2004 è divenuto endemico nel Sud Est Asiatico e ha perso la specie specificità, acquisendo la capacità di infettare i mammiferi (Perkins e Swaine, 2003).

L'A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) si ritiene sia stato il risultato di un riarrangiamento dei geni di virus circolanti nelle popolazioni di oche, quaglie e anatre allevate nella Cina continentale (Webster e Walker, 2003).

Analizzando il genoma virale si scoprì che l'aggressività e la patogenicità dimostrata dal virus nei confronti dell'ospite, in particolare nei confronti di ospiti

non aviari, erano determinati da una mutazione puntiforme a carico del gene codificante per la proteina non strutturale NS. Tale mutazione comporta una sostituzione di un singolo aminoacido, l'acido glutammico in posizione 92 della proteina NS1, che conferisce al virus la capacità di inibire l'attivazione del sistema delle citochine, eludendo quindi l'azione del sistema immunitario (Webster *et al.*, 2002).

Nel 2001 nei mercati di pollame di Hong Kong comparve una nuova varietà del ceppo H5N1, ma le drastiche misure di distruzione degli animali ne impedirono la trasmissione all'uomo. Nel 2002 apparve un altro genotipo di H5N1, una nuova versione del virus del '97, che possedeva nuove mutazioni all'interno del genoma pur conservando la medesima configurazione di HA e NA (Webster e Walker, 2003).

Alla fine del 2003 l'H5N1 ricomparve, non un virus nuovo e mai circolato prima, bensì una nuova varietà dell' A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) presentante le stesse glicoproteine di superficie ma variazioni genetiche originate da mutazioni.

Pertanto gli H5N1 isolati dai paesi dell' Est asiatico tra il 1997 e il 2004 presentano un ampio range di genotipi differenti e una gran variabilità all'interno dei diversi genotipi (Sims *et al.*, 2005), e sono il risultato di una serie di riassortimenti genetici verificatisi a partire dall' A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1), a sua volta derivato dal virus del 1996. Tali riassortimenti hanno condotto all'origine di un genotipo dominante, il genotipo Z, in grado di causare malattia manifesta in pollame, anatre domestiche e mammiferi, e responsabile degli eventi del 2003-2004 (Li *et al.*, 2004).

La determinazione del genotipo venne realizzata utilizzando come base i geni del ceppo isolato dalle oche a Guangdong nel 1996 (Goose/Guangdong/1/96): la prima evidenza fu che tutti gli H5N1 circolanti esibivano geni codificanti per le proteine di superficie derivanti proprio dal ceppo del '96. I sei geni codificanti per le proteine interne derivavano invece da altre fonti tramite riassorbimento genetico e la loro determinazione fu utilizzata come base per la descrizione e denominazione

dei diversi genotipi.

Nel 2001 si stabilirono sei genotipi differenti per l'H5N1(A, B, C, D, E ed X0) tutti derivati da riassortimento genetico; a partire dal 2002 vennero scoperti e denominati otto nuovi genotipi: V, W, X1, X2, X3, Y, Z e Zp. I genotipi A, C, D ed E ed il loro precursore comune Gs/Gd, non furono rilevati molto più a lungo, suggerendo che i nuovi genotipi, rispetto ai precedenti, esibivano una sorta di vantaggio in termini di ecologia. Tutti i genotipi, eccetto Gs/Gd e X0- X3 possedevano una mutazione a livello della proteina NS1. Similmente i virus isolati dal 2002 in poi possedevano una delezione di 20 aminoacidi a livello della proteina NA. Dal gennaio 2002 in Asia il genotipo dominante divenne lo Z che possedeva entrambe le delezioni, a livello della proteina NS1 e NA (Li *et al.*, 2004). Il genotipo Z rimpiazzò gli altri genotipi presenti, probabilmente grazie alla sua caratteristica di alta infettività manifestata sia all'interno delle specie aviari che tra specie diverse.

2.2.3 *Il rischio pandemico*

Una pandemia influenzale è definita come la diffusione su scala mondiale di una patologia che si verifica quando un nuovo ceppo di un virus influenzale di tipo A emerge tra la popolazione umana, si diffonde rapidamente e facilmente da uomo a uomo su scala mondiale, generalmente raggiungendo una distribuzione globale in un periodo di tempo inferiore ad un anno, e che causa una patologia severa in più del 25% della popolazione (WHO, 2005).

Un virus potenzialmente pandemico, si può originare mediante due meccanismi: il riassorbimento genetico e le mutazioni adattative.

Nel primo caso l'origine del virus è rapida, determinata al riassortimento del materiale genetico tra due virus diversi confettanti uno stesso ospite. Questa si suppone essere stata l'origine dei virus influenzali responsabili delle pandemie influenzali del 1957 e 1968, in cui virus di origine aviaria si ricombinarono con virus di origine umana, all'interno di un'ospite, il suino, che ha funto da sito di

ricombinazione, in quanto suscettibile alla duplice infezione.

Nel caso della mutazione adattativa, al contrario, l'evoluzione del virus è lenta, e richiede una serie di cambiamenti gradualmente, che si verificano nel corso di successive infezioni di ospiti umani o di altri mammiferi, e che gli conferiscono la capacità di trasmettersi in modo efficace tra la popolazione umana. Si suppone che il virus responsabile della disastrosa pandemia del 1918 sia originato proprio da una serie di mutazioni adattative.

Non tutti i virus così originati tuttavia, possono essere responsabili dell'esplosione di una pandemia.

Perché questo si verifichi il virus emergente deve soddisfare tre condizioni: deve appartenere ad un sottotipo HA che non ha circolato tra la popolazione umana almeno per una generazione; deve infettare e replicare efficacemente in cellule umane; deve diffondersi facilmente e rapidamente tra la popolazione umana.

Non sono stati riportati storicamente molti casi di infezione umana sostenuta da virus aviari, e nei rari casi la patologia risultante era caratterizzata da segni clinici non gravi, solitamente congiuntivite virale, seguita da una rapida e completa guarigione (Lee Ligon, 2005).

L'emergenza dell'H5N1 ha fornito un'eccezione a questa evidenza storica, ed ha dimostrato, provocando la comparsa di malattia in 18 persone, e la morte di 6 tra queste, nella provincia di Hong Kong SAR in corso dei focolai esplosi tra il pollame domestico nel 1997, che i virus influenzali hanno la capacità di causare severa e mortale patologia nell'uomo.

Una caratteristica clinica che attirò molto l'attenzione fu la presenza di una severa polmonite virale primaria nella maggior parte dei casi. Questo aspetto della patogenesi del virus, si tradusse in una sintomatologia gravissima, rapidamente fatale.

Nel corso del 2003 e del 2004 il numero di casi umani aumentò, e tuttora si registrano casi di infezione e mortalità tra la popolazione dei Paesi colpiti da gravi epidemie sostenute da H5N1 nel pollame domestico. Il crescente numero di casi

umani e la mortalità provocata hanno evidenziato due caratteristiche del virus che lo rendono il potenziale responsabile dell'esplosione di una nuova pandemia influenzale, ovvero la capacità di infettare direttamente l'uomo in seguito ad una trasmissione diretta uccello – ospite umano, e la gravità dei segni clinici causati e l'alta mortalità. Il fatto che il virus circolante tra il pollame abbia infettato l'uomo ha posto in evidenza come l'uomo stesso possa fungere da “mixing vessel”, e che, senza un' obbligatoria infezione di un'ospite intermedio, il virus possa andare incontro a riassortimento genetico o a graduali mutazioni adattative ed evolvere ad una forma esibente un' alta patogenicità per l'ospite umano ed in grado di trasmettersi in maniera efficace da uomo a uomo. Inoltre i cambiamenti di ecologia ed epidemiologia esibiti dal virus dal 2004 in poi sembrano suggerire che il virus si stesse evolvendo e assumendo tratti che potessero aumentare il suo potenziale pandemico (WHO, 2005). In particolare il fatto che il virus abbia raggiunto lo stato endemico in molte zone dell'Asia, e abbia stabilito la sua nicchia ecologica permanente nel pollame, fornisce una possibilità continua di insorgenza di nuovi casi umani e una possibilità continua di mutazioni adattative che conducano all'origine di un virus con potenziale pandemico.

Il differente comportamento del virus nei confronti degli uccelli acquatici migratori e il ritrovamento di anatre domestiche asintomatiche ma positive al virus, suggerirono un nuovo rapporto del virus con i suoi ospiti abituali.

In particolare, la presenza di anatre domestiche infette ma asintomatiche, data la frequenza con cui questi animali sono presenti tra gli uccelli allevati ruralmente dalle famiglie del Sud Est asiatico, fornisce un'ottima probabilità di trasmissione del virus all'uomo.

L'H5N1, inoltre, ha dimostrato un progressivo ampliamento dello spettro d'ospite, esibendo la capacità di infettare anche mammiferi, e causare patologia grave e mortale; infezioni sperimentali hanno rivelato una maggior patogenicità dei ceppi isolati successivamente al 2003 nei confronti del topo, utilizzato come modello per lo studio della patogenesi nei mammiferi.

Attualmente la *World Health Organization* ha dichiarato il livello di allarme pandemico pari a 3. Il virus infatti, delle tre condizioni che devono essere possedute per essere in grado di determinare la comparsa di una pandemia, attualmente ne soddisfa solo due. La maggior parte della popolazione infatti non possiede alcun tipo di memoria immunitaria nei confronti del sottotipo H5 e N1, pertanto praticamente tutta la popolazione mondiale sarebbe suscettibile all'infezione. Per quanto concerne la seconda caratteristica, ovvero l'efficacia di infezione e replicazione all'interno dell'ospite umano, è stato dimostrato che la sostituzione di due aminoacidi a livello del sito di legame per il recettore della proteina HA dell'H5N1 asiatico ottimizza il legame ai recettori di tipo α_2-6 , tipicamente esposti dalle cellule epiteliali dell'apparato respiratorio umano, conferendo una capacità infettante e di replicazione simile a quella posseduta dai comuni virus influenzali umani (Harvey *et al*, 2004). Sino ad oggi il virus non ha dimostrato di possedere la capacità di trasmettersi in maniera efficace da uomo a uomo.

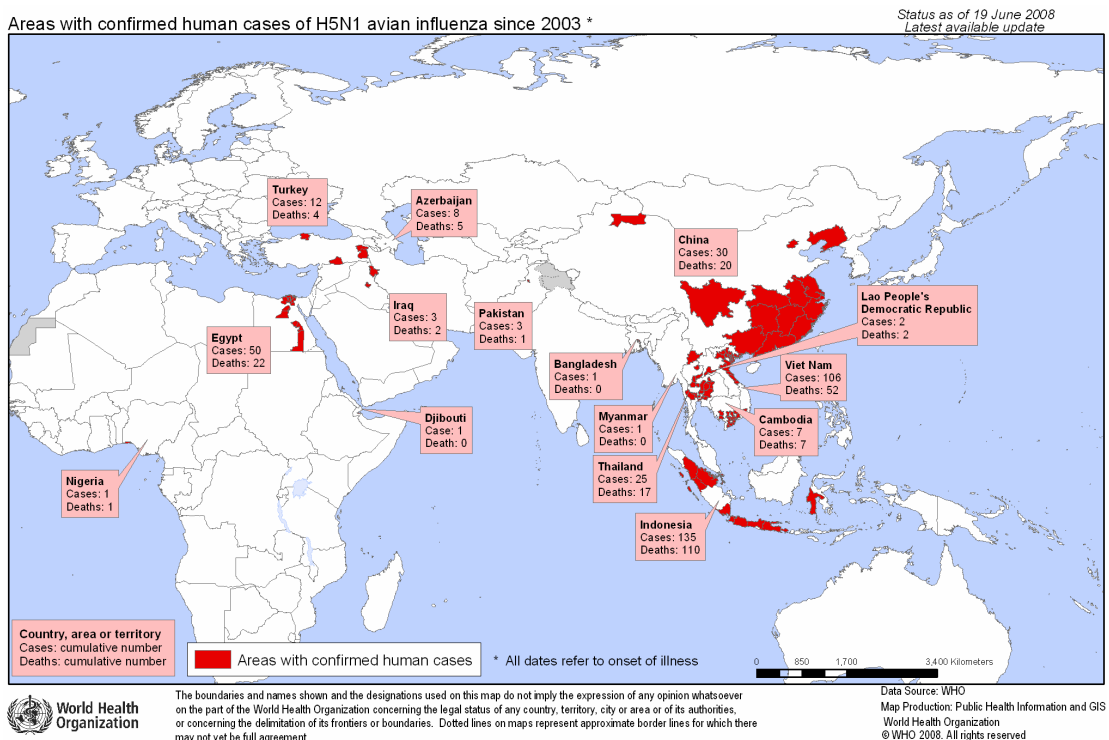


Fig. 4 - Casi confermati da influenza aviare H5N1 nell'uomo dal 2003 al 2008

2.2.4 Altri virus potenziali responsabili di pandemia

L'H5N1 tuttavia non è l'unico virus influenzale che può essere causa di una pandemia, altri virus, appartenenti ai sottotipi H7 e H9, devono essere presi in considerazione. In particolare un H9N2 si sta diffondendo ampiamente tra il pollame dei Paesi asiatici e tra la popolazione di suini del Sud Est, Est della Cina, nel 1999 ha provocato 7 casi di patologia nell'uomo, caratterizzati da una lieve sintomatologia respiratoria seguita da totale guarigione, e nel 2003 un nuovo singolo caso. Questo virus, oltre ad esibire un ampio spettro d'ospite, ha dimostrato possedere una maggiore affinità per i recettori $\alpha_2,6$.

Nel 2003 inoltre in Olanda si registrò un focolaio di influenza tra il pollame domestico sostenuto da un H7N7. Nello stesso anno almeno 82 persone furono infettate dal virus, la malattia che ne risultò dimostrò avere un decorso benigno,

infatti la maggior parte dei pazienti manifestarono una congiuntivite, 7 persone svilupparono i tipici sintomi influenzali, e solo un caso fu fatale. Altri virus potenzialmente in grado di causare una pandemia sono gli H2, proprio perché già lo furono nel passato, e gli H6 che sono ampiamente circolanti all'interno della popolazione di pollame in Asia e Nord America.

PARTE III
IL RUOLO EPIDEMIOLOGICO
DEI VOLATILI SELVATICI

3.1 IL RUOLO EPIDEMIOLOGICO DEGLI UCCELLI MIGRATORI

3.1.1 Il cambiamento di ecologia del virus

Il primo episodio di mortalità tra uccelli selvatici determinato da un virus influenzale risale al 1961 quando in Sud Africa si registrò una moria di quasi 1300 sterne (Becker, 1966); il fatto era senza precedenti perché i virus influenzali isolati dai selvatici fino a quel momento erano tutti LPAI virus.

Fino agli ultimi anni infatti la segnalazione di virus HPAI in uccelli selvatici era sporadica, e sempre collegata a focolai nel pollame domestico. Abitualmente virus HPAI venivano isolati da specie sinantropiche (passeriformi, piccioni, ecc..) residenti nelle vicinanze di aree infette, come avvenne in Italia (Magnino *et al.*, 2000) e nei Paesi Bassi (Philippa *et al.*, 2005). A partire dal 2002 HPAI virus, in particolare H5N1 vennero isolati occasionalmente da animali morti o moribondi, nella maggior parte dei casi ad una distanza limitata da un allevamento infetto; ciò fece supporre che gli uccelli selvatici costituissero una sorta di ospite a fondo cieco per un virus circolante all'interno delle popolazioni di volatili allevati e letale per questi. L'ipotesi era suffragata dal fatto che mancava qualsiasi prova della trasmissione dell'H5N1 tra la popolazione di uccelli selvatici o della capacità di questi di trasportare il virus a lunga distanza lungo le rotte migratorie (Chen *et al.*, 2005).

Nel gennaio del 2003 altri uccelli acquatici, in particolare fenicotteri, morirono per un H5N1 nel Kowloon Park ad Hong Kong (FAO).

Il 30 aprile 2005 si registrò una moria di uccelli selvatici sul lago Qinghai, zona di raduno di moltissime specie di uccelli migratori. I primi uccelli ad essere colpiti furono moltissimi esemplari di Oca Indiana (*Anser Indicus*), ma ben presto la malattia raggiunse altre specie, prevalentemente gabbiani testanera (*Larus brunnicephalus*), gabbiani del Pallas (*Larus ichthyaetus*) e cormorani

(*Phalacrocorax carbo*), provocando la morte di più di 6000 animali (FAO, Issue n. 33).

Questi ultimi fatti suggerirono che il virus aveva in parte mutato la sua ecologia e che uccideva il suo reservoir. Gli uccelli migratori da cui venne isolato il virus a partire dal 2004 erano, infatti, gravemente malati o già morti, rendendo evidente il fatto che non erano in grado di trasportare il virus a lunga distanza e diffondere l'infezione, a differenza di quando albergavano LPAI virus che erano assolutamente innocui per loro (Sims *et al.*, 2005).

Il fatto che, inoltre, la moria verificatasi su lago fosse originata in una zona lontana da qualsiasi allevamento di pollame rafforzò l'ipotesi che virus altamente patogeni potessero infettare primariamente gli uccelli selvatici, senza che fosse necessario il contagio di questi da parte di uccelli allevati. Le analisi effettuate sui virus isolati nei tessuti degli uccelli morti nel Lago Qinghai dimostrarono infatti che la trasmissione era avvenuta in primo luogo tra le oche selvatiche per diffondersi secondariamente agli alti uccelli migratori che visitavano le acque del lago.

Questo suggerì un'ulteriore ipotesi, ovvero che il virus, se in grado di trasmettersi tra uccelli selvatici migratori, potesse essere trasportato lungo le rotte migratorie invernali da parte di specie o individui ipoteticamente meno sensibili all'infezione, in cui lo stato di salute non fosse compromesso tanto da impedirne gli spostamenti stagionali (Chen *et al.*, 2005).

Nei mesi successivi all'aprile/maggio 2005 la moria di uccelli selvatici proseguì interessando Russia, Mongolia, Cina Occidentale, Kazakhstan, e da queste aree si diffuse all'Europa centrale (Croazia, Romania, Turchia, nell'autunno dello stesso anno) e al resto dell'Europa (2005/06), rafforzando l'ipotesi che non tutti gli uccelli selvatici infettati con un HPAI virus andassero incontro a malattia e morte, ma una parte della popolazione trasportasse il virus a lunga distanza lungo le rotte migratorie (FAO, Issue n. 33). Nella diffusione del virus un ruolo epidemiologico primario sembra sia stato rivestito dal cigno reale (*Cygnus olor*); cigni infetti sono

stati infatti trovati sistematicamente in tutte le epidemie, insieme ad altri uccelli acquatici o come unica specie coinvolta. In Italia le positività virologiche erano tutte riferite a cigni reali, a parte un caso di positività in un germano reale.

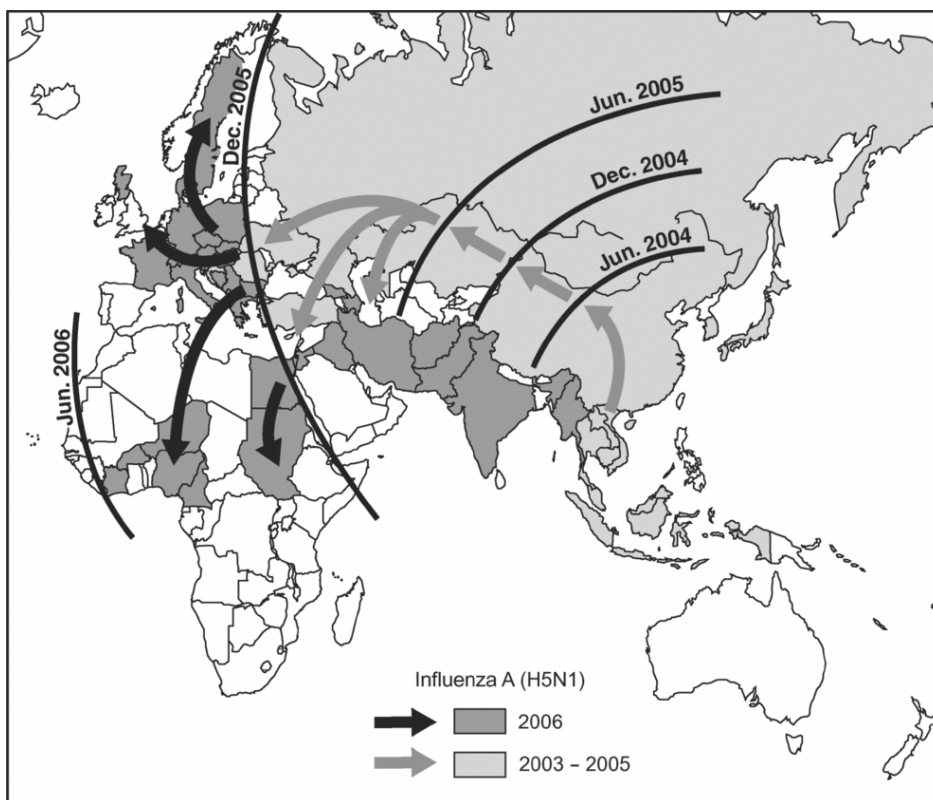


Fig. 5 - Paesi nei quali sono segnalati focolai di influenza A H5N1 negli uccelli selvatici e nel pollame domestico (dicembre 2003-maggio 2006), differenziati tra quelli in cui i primi casi risalgono al periodo gennaio-maggio 2006 (grigio scuro) e quelli con casi segnalati negli anni precedenti, fino al 2005 (grigio chiaro). Fonte: *Disease Information* (Paris: OIE, 12 December 2003-18 May 2006).

Se prima dell' aprile 2005 il ritrovamento di uccelli morti positivi ad un HPAIV era un evento sporadico e riscontrato entro la distanza di volo di un focolaio di epidemia aviaria, con la mortalità verificatasi sul lago Qinghai il virus dimostrò la capacità di sconvolgere la stabile relazione con il suo ospite naturale. Sembra che

alcune specie di uccelli selvatici siano divenute portatrici del virus H5N1 nella sua forma altamente patogena e quindi in grado di trasmetterlo ad altri selvatici così come a pollame domestico, mentre si spostano lungo le loro rotte migratorie. Ciò è confermato dai risultati dell'analisi dei virus responsabili di epidemie apparse tra i volatili appartenenti ai Paesi recentemente colpiti: questi virus sono praticamente identici a quelli isolati dai migratori morti sul lago Qinghai (OMS scheda tecnica).

3.1.2 Verso un nuovo rapporto tra uccelli migratori e HPAI virus

Come già esposto a proposito dell'epidemiologia del virus, le popolazioni di uccelli selvatici fungono da reservoir naturale di tutti i 16 sottotipi di HA e i 9 sottotipi di NA, albergandoli nella forma a bassa patogenicità assolutamente innocua per loro.

Questi animali, successivamente ad un contatto diretto o indiretto con popolazioni di pollame domestico, sono in grado di trasmettere a queste il virus generalmente nella forma scarsamente patogena. Il virus trasmesso, circolando per un po' di tempo all'interno della popolazione domestica, può andare incontro ad una serie di modificazioni genetiche che gli conferiscono il carattere di alta patogenicità per il pollame. Il nuovo HPAI virus potrebbe anche essere ritrasmesso alle popolazioni selvatiche, grazie ad una sua diffusione nell'ambiente. La reinfezione delle popolazioni selvatiche con il ceppo altamente patogeno non necessariamente comporta la comparsa di malattia manifesta: è stato infatti dimostrato che virus classificati in base al criterio OIE, virus altamente patogeni per il pollame, nelle anatre selvatiche si comportano in realtà come LPAI virus (Alexander *et al.*, 1978). Ciò può essere in parte determinato dal fatto che la maggior parte degli individui di una popolazione, in quanto reservoir di LPAI virus, possiedono un certo grado di immunità umorale nei confronti di sottotipi omologhi e di immunità cellulare diretta verso i geni più interni.

Dalla primavera 2005, con il verificarsi di episodi di mortalità associata all'infezione da virus H5N1, questo rapporto tra uccelli selvatici e HPAI virus è

cambiato di fronte all'evidenza che anche tra le popolazioni selvatiche può originare un virus altamente patogeno in grado di trasmettersi, diffondersi e causare significative percentuali di mortalità. Ciò che non è chiaro è se gli uccelli selvatici possano fungere da reservoir anche per HPAI virus, albergandoli nel loro organismo in forma subclinica, e se possano trasportarli dunque a distanza con le migrazioni stagionali.

3.1.3 Patogenesi dell'infezione da H5N1 negli uccelli selvatici

Per valutare la patogenicità dell'H5N1 negli uccelli selvatici, vennero effettuati a partire dal 2002 degli studi sulle conseguenze dell'infezione sperimentale di specie di uccelli diverse dal pollame domestico con svariati ceppi di H5N1 isolati ad Hong Kong. Le specie scelte per l'esperimento comprendevano: gabbiani (*Larus atricilla*) (Perkins e Staine, 2002a), piccioni (*Colomba Livia*), emù (*Dromaius novahollandiae*) (Perkins e Staine, 2002b), diamanti mandarino (*Taeniopygia guttata*), scriccioli (*Melapsittacus undulatus*), fringuelli (*Carpadacus Mexicanus*), passeri (*Passer domesticus*), storni (*Sturnus vulgaris*) (Perkins e Staine, 2003b), e germani (*Anas platyrhynchos*) (Sturm- Ramirez *et al.*, 2004).

Per ogni animale venne considerata la dose infettante, la via di infezione, il periodo di incubazione, morbilità, mortalità, segni clinici, dose e durata dell'escrezione virale.

In relazione alla via di escrezione virale si rilevò una maggiore concentrazione di virus nelle secrezioni tracheali rispetto al materiale prelevato dalla cloaca (Sturm-Ramirez *et al.*, 2004), suggerendo la conclusione che l'eliminazione del virus non avvenisse per via fecale, ma che la via di elezione per la diffusione di nuove particelle virali fosse la via respiratoria, similmente a quanto si verifica tra il pollame e tutti gli altri possibili ospiti di un virus influenzale. La conseguenza diretta di un simile cambio nell'epidemiologia dell'infezione è la nuova importanza assunta dal mezzo aerosol nella trasmissione dell'infezione, e la minor importanza

delle acque delle zone di sosta degli uccelli acquatici, in virtù dell'alta concentrazione di materiale fecale presente. Per quanto riguarda la quantità di virus eliminato e la durata dell'eliminazione virale i risultati ottenuti furono molto variabili a seconda della specie e del patotipo virale utilizzato per infettare gli animali.

Per quanto concerne i segni clinici i risultati variarono, ma non molto, a seconda delle specie. Ad eccezione dei diamanti mandarino, infatti, nessun gruppo di animali sviluppò segni clinici di carattere acuto o iperacuto con replicazione sistemica del virus; emù, scriccioli e fringuelli svilupparono una sintomatologia neurologica con alte concentrazioni di virus a livello cerebrale; passeri, gabbiani, piccioni e storni manifestarono solo una lieve sintomatologia clinica o non la svilupparono affatto. I germani, invece, vennero infettati con 17 ceppi isolati ad Hong Kong tra il 1997 e il 2003, e svilupparono segni clinici molto differenti in funzione del ceppo di H5N1 utilizzato per l'infezione sperimentale.

I gruppi di animali infettati con ceppi isolati prima del 2002 infatti svilupparono segni clinici lievi e morbilità e mortalità bassa o assente (Sturm-Ramirez *et al.*, 2004; Sturm-Ramirez *et al.*, 2005; Hulse-Post *et al.*, 2005), mentre i gruppi infettati con ceppi isolati dopo il 2002 svilupparono una sintomatologia neurologica e tassi di morbilità e mortalità significativi.

Pertanto si può concludere che animali che non sviluppano affatto segni clinici o che ne sviluppano di lievi e transitori sarebbero ipoteticamente in grado di fungere da "carriers" del virus lungo le rotte migratorie, ma se il virus agisce sull'ospite provocando una patologia evidente, come nel caso dei germani infettati con virus circolanti ad Hong Kong dal 2002 in poi, compromette la capacità dell'animale di migrare e diffondere l'infezione.

Virus isolati più di recente, tuttavia, sembrano essere un miscuglio di differenti patotipi (Chen *et al.*, 2006), e tra i vari miscugli, potrebbero essere divenuti dominanti patotipi che manifestano una patogenicità minore nei confronti delle anatre selvatiche, pur mantenendo inalterato il loro potenziale patogeno nei

confronti del pollame (Hulse-Post *et al.*, 2005).

Dati di positività all'H5N1 rilevati in anatre selvatiche apparentemente sane (Chen *et al.*, 2005) e il ritrovamento di cigni apparentemente sani positivi al virus in Croazia e Polonia (Birdlife, 2006) infatti, fanno pensare che il virus possa non causare patologia evidente anche in alcuni selvatici e possa essere quindi trasportato da questi a lunga distanza.

3.1.4 Stabilità ambientale dell'H5N1

Se realmente l'infezione può essere trasportata lungo le rotte migratorie e introdotta in nuovi Paesi tramite gli uccelli selvatici, un fattore importante per la sua trasmissione e diffusione a livello epidemico è la stabilità ambientale del virus. Non ci sono molti studi di tipo comparativo in merito alla stabilità ambientale dei diversi ceppi e sub-tipi di virus influenzali, quindi risulta difficile valutare se l'H5N1 presenti caratteristiche di rilevanza in termini di resistenza nell'ambiente rispetto ai virus comunemente isolati. Tuttavia studi recenti sembrano aver messo in risalto una recente stabilità ambientale dell'H5N1 (Webster *et al.*, 2006).

Verrà considerata la stabilità del virus alla temperatura, nelle feci, nell'acqua, nell'aerosol e nelle carcasse.

Per quanto riguarda la temperatura, l'OIE, in termini generali, definisce inattivato un virus influenzale quando è esposto ad una temperatura di 56° C per 3 ore o a 60° per 30 minuti. Per valutare la resistenza dell'H5N1 sono state effettuate numerose prove e si può affermare che l'applicazione di una temperatura pari a 60-65 ° C per tempi superiori ai 5 minuti causa la completa inattivazione del virus, (Songserm *et al.*, 2006), ma la presenza di un substrato proteico costituito di proteine essiccate, può aumentarne la resistenza a temperature più alte (Swaine e Beck, 2004).

In proposito alla resistenza nel materiale fecale, come tutti i virus influenzali anche l' H5N1 dimostra una notevole sopravvivenza: in feci di pollo, infatti, a temperature comprese tra i 25 e i 32 gradi C il virus si mantiene attivo e infettante per almeno 4

giorni (Songserm *et al.*, 2006). Il potere infettante viene mantenuto tanto più a lungo quanto più bassa è la temperatura ambientale. Per quanto riguarda la resistenza del virus nelle acque, in termini generali si può affermare che questa è elevata e tanto maggiore quanto minore è la temperatura del mezzo, infatti, come già esposto a proposito dei meccanismi di perpetuazione dell'infezione all'interno delle popolazioni di anatre selvatiche, una delle teorie proposte è proprio la conservazione del virus nelle acque ghiacciate degli specchi d'acqua visitati dagli uccelli durante il periodo di riproduzione.

Da studi effettuati sulla resistenza nelle acque di cinque differenti subtipi di virus influenzali emerse che alcuni subtipi sembrano essere perfettamente adattati alla sopravvivenza nelle acque, ma in termini comparativi l'H5N1 non è tra questi, anzi sembra essere il meno resistente (Stallknecht *et al.*, 1990).

A dispetto della maggior carica virale isolata dai tamponi tracheali dei germani infettati per via sperimentale rispetto a quella isolata dai tamponi cloacali (Hulse-Post *et al.*, 2005), che fa supporre una maggior importanza, in termini di ecologia del virus, della via di trasmissione tramite aerosol, non ci sono state evidenze cliniche di trasmissione per via aerea dell'H5N1 tra uccelli in quarantena tenuti all'interno della stessa stanza ma in gabbie separate. La stabilità del virus nelle carcasse, infine, è funzione anch'essa della temperatura ambientale. Il virus è in grado di mantenere la sua infettività anche all'interno di tessuti di animali morti come confermano le numerose trasmissioni verificatesi in Asia del virus da uccelli morti a felini che se ne erano alimentati.

3.1.5 Ecologia delle specie di anatidi a rischio di esposizione all'H5N1

Le specie di anatidi migratrici presentano tutte un ciclo annuale comune, in cui si riconoscono cinque fasi distinte, corrispondenti a periodi dell'anno relativamente critici per il singolo individuo, perché la richiesta energetica è maggiore. Tali momenti sono la migrazione estiva, la riproduzione, la muta, la migrazione estiva e

lo svernamento.

Come già discusso a proposito dei movimenti migratori, i periodi e le rotte migratorie scelte per la migrazione estiva e autunnale sono specie specifici, e all'interno delle diverse specie possono essere riconosciuti due principali tipologie di movimenti: gli spostamenti a lunga distanza degli uccelli dell'emisfero settentrionale e i movimenti a raggio notevolmente minore di quegli uccelli che popolano le zone tropicali e l'emisfero boreale.

Le zone scelte per la riproduzione e lo svernamento sono similmente anch'esse specie specifiche; una caratteristica degli anatidi è quella di esibire un'elevata fedeltà alle zone meta delle migrazioni (Rohwer e Anderson, 1988), sia nella migrazione di andata che in quella di ritorno. Tale caratteristica, chiamata filopatria, è più spiccata nelle femmine adulte che presentano una notevole precisione nello scegliere come zone di riproduzione le medesime dove sono nate, mentre i maschi presentano fenomeni di dispersione più marcati a luoghi di riproduzione diversi per la ricerca di una compagna, fenomeno questo che da un punto di vista evolutivo trova una sua spiegazione nell'importanza di evitare fenomeni di *inbreeding* (Bateson, 1983).

Un'altra caratteristica degli anatidi è di effettuare vere e proprie migrazioni per la muta successivamente alla riproduzione, del tutto indipendenti dalla migrazione autunnale in quanto le zone scelte per l'evento sono in direzione opposta rispetto alle zone di svernamento e sempre le medesime in anni successivi; tale precisione nella localizzazione, e l'eccezionale densità di animali che raggiunge questi siti suggerisce che questi movimenti autunnali rappresentino una strategia comportamentale altamente evoluta. All'interno di una stessa specie, gli anatidi esibiscono differenze nel pattern migratorio e nella muta tra individui di una stessa popolazione in relazione all'età e al sesso dell'animale.

Si può considerare infatti che adulti e giovani intraprendano la migrazione estiva in febbraio per terminarla alla fine di aprile e quella autunnale a settembre per ultimarla a fine novembre. Per quanto riguarda gli adulti le femmine riconoscono

una durata maggiore della stagione riproduttiva, in quanto si spostano verso i centri di congregazione per la muta un mese dopo rispetto ai maschi. I maschi infatti abbandonano le terre di riproduzione immediatamente dopo l'accoppiamento, le femmine vi permangono fino a che i giovani dell'annata sono in grado di volare.

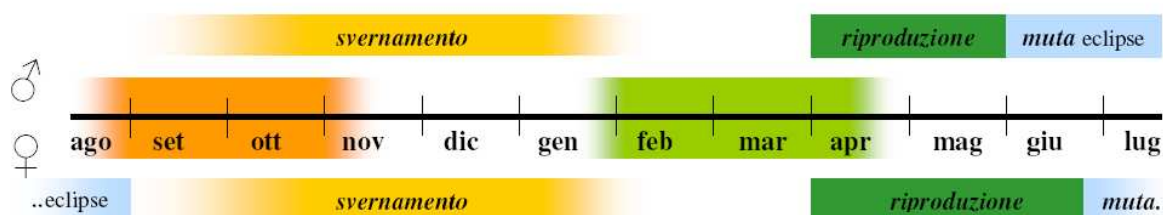


Fig. 6 - Ciclo annuale degli anatidi selvatici.

3.2 MIGRAZIONI E ALTRI SPOSTAMENTI DEGLI UCCELLI SELVATICI

3.2.1 *Metodi di studio dei movimenti degli uccelli*

Gli spostamenti effettuati dagli uccelli sono stati, e sono tuttora studiati, avvalendosi di metodi differenti.

Il primo metodo storicamente utilizzato consiste nell'osservazione diretta degli uccelli in volo, osservando le specie che percorrono uno spazio noto in riferimento al periodo di tempo in cui ciò si verifica.

Un altro metodo utilizzato è la registrazione acustica dei richiami emessi dalle varie specie di uccelli; tali richiami fungono da segnali intraspecifici, per richiamare i componenti dello stormo al fine di iniziare la migrazione o correggerne la direzione. Questa metodica ha fornito un ottimo ausilio per identificare il passaggio di migratori notturni e definire un pattern migratorio, soprattutto per specie la cui osservazione diretta risulta difficile.

Metodi più tecnologici comprendono l'utilizzo del radar, della telemetria o del "satellite tracking". Il radar permette di individuare il passaggio di stormi di uccelli all'interno di un raggio di captazione che si estende per molti chilometri, e la massa dei volatili viene rappresentata su un monitor come una nuvola di punti, in cui ogni punto rappresenta un elemento del gruppo. Lo svantaggio della metodica è che pur rilevando con precisione il passaggio degli uccelli non permette una distinzione delle specie, se non una differenziazione molto generica in relazione alla dimensione corporea.

La telemetria consiste nell'applicazione, generalmente a livello del dorso dell'uccello, di una trasmittente di pochissimo peso (circa 1gr) che emette segnali radio che sono ricevuti da un apparecchio ricevente anche a molti chilometri di distanza. Chiaramente questa tecnica possiede inconvenienti legati alla scarsa vita delle trasmissioni, il costo dell'occorrente e la scarsa maneggevolezza

dell'apparecchio ricevente. Un'applicazione più recente della telemetria è il tracking da satellite, il cui principio è lo stesso, ma le trasmissioni utilizzate devono essere più grandi e più potenti, e il segnale emesso viene captato da un satellite.

Certamente il metodo più usato per lo studio dei movimenti degli uccelli è l'inanellamento. L'apposizione dell'anello alla zampa permette di registrare i successivi spostamenti dell'animale in relazione al luogo di prima cattura. Le informazioni fornite dalla lettura degli anelli unitamente ai risultati dei censimenti, permettono di stabilire quali sono le zone utilizzate preferenzialmente dagli uccelli e quali siano i loro spostamenti.

3.2.2 *Le migrazioni stagionali*

Gli uccelli possono essere suddivisi in relazione al tipo di spostamenti che compiono durante l'anno in tre categorie: stanziali (sono presenti tutto l'anno nella stessa area geografica), semistanziali (parte della popolazione si sposta, parte rimane ferma tutto l'anno nello stesso territorio) e migratori (l'intera popolazione compie spostamenti perché riconosce due distinte zone, una per trascorrere il periodo di riproduzione e una per trascorrere il periodo invernale).

Le specie appartenenti al terzo gruppo compiono, oltre a molteplici spostamenti più o meno regolari, i cosiddetti movimenti a piccolo raggio, veri e propri viaggi ripetuti ogni anno, movimenti ad ampio raggio, le cosiddette migrazioni stagionali. Precisamente con tale termine si definiscono i movimenti annuali tra le zone di riproduzione, generalmente localizzate più a nord e le zone di svernamento, o quartieri invernali, localizzati più a sud rispetto alle precedenti.

Pertanto nel corso di un anno solare le specie migranti intraprendono due viaggi, comunemente definiti migrazione primaverile e migrazione autunnale. La migrazione primaverile viene intrapresa all'inizio della primavera, generalmente il picco delle partenze inizia a fine febbraio - inizio marzo e termina a fine maggio - primi di giugno; gli uccelli lasciano le zone in cui hanno trascorso i mesi freddi

invernali e si dirigono a nord, verso le terre di riproduzione in cui nidificano. Viceversa la migrazione autunnale inizia generalmente a fine estate – inizio autunno, con alcune specie che iniziano a partire a giugno e le ultime che lasciano le zone di riproduzione a novembre, e porta gli animali a sud verso il clima mite delle “residenze invernali”.

Le diverse specie mostrano una enorme variabilità nella tempistica dei viaggi migratori, essendoci alcune specie che raggiungono le zone di svernamento durante l'estate, quando in linea generale la maggior parte delle specie vi giunge in autunno, o altre che arrivano precocemente alle zone di nidificazione.

Pertanto i termini migrazione autunnale e migrazione primaverile, se pur adeguati in termini generali, non rispecchiano le eccezioni, e possono essere sostituiti con i termini di migrazione di andata, intesa come il viaggio verso le zone fredde di riproduzione, e migrazione di ritorno, inteso come il viaggio intrapreso in direzione sud verso le zone di svernamento (Berthold, 1993).

Ci sono inoltre notevoli differenze interspecifiche in relazione alle modalità con cui vengono intrapresi tali spostamenti: ci sono specie in cui tutta la popolazione si sposta contemporaneamente, altre in cui si osservano partenze differenziate tra i vari individui in relazione al sesso e all'età. Ciò che determina i movimenti annuali di intere popolazioni di uccelli sono gli stagionali cambiamenti climatici dell'ambiente in cui vivono, che condizionano la disponibilità di cibo. Chiaramente qualsiasi evento in grado di modificare l'equilibrio adattativo della popolazione, quale un inatteso cambiamento climatico o l'aumento notevole di una popolazione di uccelli, può fungere da fattore causale per l'intrapresa di spostamenti fuori programma. Ne sono un esempio le '*cold weather migrations*' e le '*reverse migrations*'.

Nel primo caso il termine descrive lo spostamento di un cospicuo numero di uccelli dalla zona in cui stanno svernando ad una zona con clima più mite, conseguentemente alla comparsa di condizioni climatiche critiche al punto da determinare carenza di cibo. Per '*reverse migration*' si intende l'improvvisa

inversione della direzione percorsa lungo una precisa rotta migratoria in conseguenza di condizioni climatiche gravi e inaspettate. Anche un singolo individuo può variare autonomamente la sua rotta migratoria. E' ciò che si verifica nel fenomeno *dell'abmigrazione*. Non è caso raro che popolazioni della stessa specie ma percorrenti rotte migratorie differenti e nidificanti in siti distinti, si incontrino in corrispondenza delle zone di svernamento. Se un maschio di una popolazione decide di accoppiarsi con una femmina appartenente all'altra popolazione, può decidere di seguire la femmina e la sua popolazione alle terre di riproduzione, abbandonando così la rotta migratoria e le terre nordiche tipiche del suo stormo.

3.2.3 *Rotte migratorie principali*

Durante la migrazione di andata gli uccelli seguirebbero una traiettoria diretta a sud ovest, mentre nella migrazione di ritorno la rotta viene invertita e diviene nord est. Questa considerazione, tuttavia, è valida se viene considerata in termini molto generali: la direzione del passo è influenzata infatti da molti fattori che possono essere distinti in due gruppi: i fattori intrinseci ed i fattori estrinseci.

Il primo gruppo comprende i fattori ereditari e genetici che costituiscono la spinta e la guida innata di ogni specie a percorrere esattamente il proprio cammino migratorio; il secondo comprende tutti i fattori esterni all'animale, primo tra questi la geomorfologia dei territori, nello specifico la distribuzione delle terre, dei mari, dei deserti, dei fiumi, che, con significato e modalità diverse a seconda dell'ecologia e dell'habitat preferenziale delle diverse specie, possono determinare variazioni delle rotte migratorie.

Altro fattore estrinseco è rappresentato dal clima: la presenza di temporali, di correnti ventose, l'alternanza di alta e bassa pressione influiscono sulla quantità di spazio percorso, su eventuali soste e deviazioni.

Le rotte migratorie sono percorsi specie specifici, così come la tipologia di viaggio,

la quantità di fermate effettuate dagli uccelli per riposare e nutrirsi nelle aree di sosta, il numero di soggetti appartenenti ad una popolazione che partecipano alla migrazione. Pur essendoci queste differenze possono essere ricostruite sulla superficie terrestre delle rotte migratorie generali.

Il continente Americano è attraversato da tre rotte migratorie principali: la rotta del Mississippi, quella del Pacifico e quella dell'Atlantico. L'oceano Atlantico ospita una seconda rotta migratoria, definita "ad imbuto", che accoglie, data la grande estensione a nord, gli uccelli che nidificano in una fascia di terre che si estende molto in latitudine, e include l'Alaska, l'Europa del Nord e la Siberia. Tale rotta dirigendosi a Sud si restringe, costeggia le terre bagnate sul versante est dall'Oceano Atlantico, comprendendo i Paesi dell' Europa del Nord, la Penisola Iberica e le coste dell'Africa.

L'Africa, in quanto quartiere invernale tipico di molte specie è raggiunta da rotte che originano nell'Europa nord orientale, come la rotta Mar Morto- Mar Mediterraneo, o nell'Asia Occidentale, come la rotta per l'appunto chiamata Asia occidentale-Africa orientale.

Gli uccelli che si spostano all'interno del continente Asiatico seguono due principali vie: la rotta dell'Asia centrale, interessata da quegli animali che nidificano nelle regioni dell'Asia settentrionale e centrale e svernano in India, Indocina o nella penisola della Malesia; e la Est Asia- Australia.

Non sempre la direzione tenuta durante la migrazione di andata viene conservata durante la migrazione di ritorno, capita invece che al ritorno dalle zone di riproduzione alcune specie di uccelli compiano dei percorsi simil circolari.

Questo fenomeno è piuttosto frequente, ma l'origine e il significato di tali deviazioni dal percorso originale non è stato approfonditamente studiato (Berthold, 1993), anche se si suppone essere determinato dalla disponibilità stagionale di habitats in certe zone.

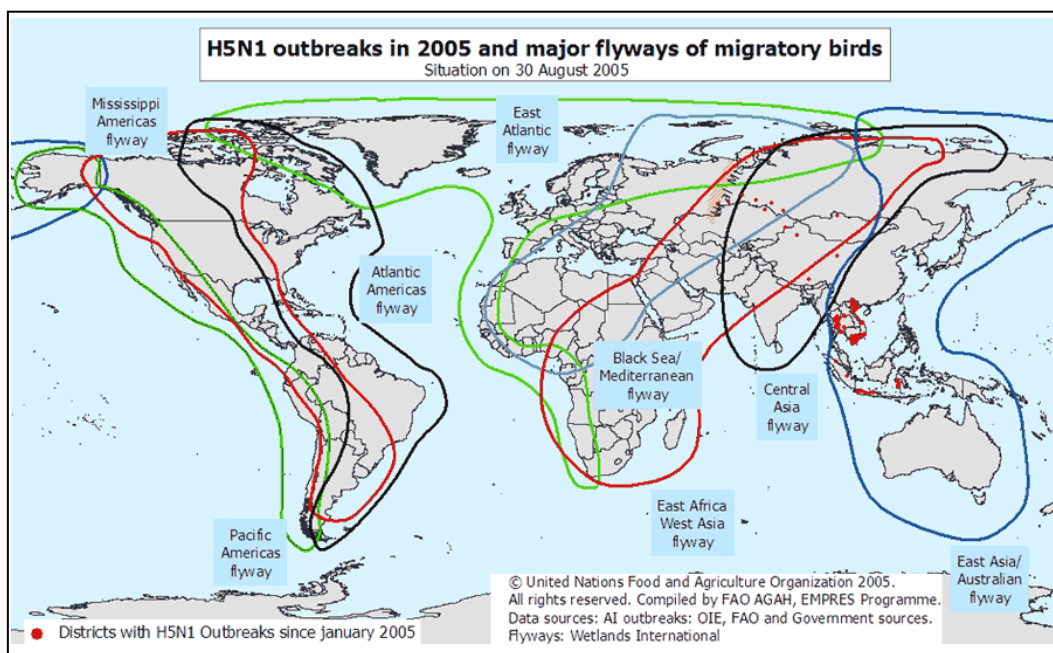


Fig. 7 - Principali rotte migratorie degli uccelli selvatici e focolai di HPAI H5N1 (aggiornamento: Agosto 2005). Fonte: FAO

3.2.4 Aree interessate dalla migrazione

▪ Aree di sosta

Il cammino migratorio può essere percorso sottoforma di viaggio singolo e continuo o come insieme di tappe intervallate dalla sosta in aree poste lungo il cammino, o in una sua deviazione. Tali soste sono utilizzate dagli uccelli per nutrirsi e riposarsi.

Come già accennato, il tipo di luoghi scelto per le soste è strettamente condizionato dall'ecologia della specie, in particolare dalla possibilità di trovarvi quantità di cibo adeguate. Ugualmente anche la frequenza e il numero di siti è specie specifico, ed è funzione della strategia di volo utilizzata, della distanza che deve essere percorsa e della capacità metabolica di stoccare i grassi come forma di riserva energetica.

La conoscenza del tipo di habitat necessario ad una specie, e le sue abitudini sociali (tendenza gregaria più o meno spiccata), associate ad un'analisi e conoscenza delle

caratteristiche del territorio, possono essere utilizzate per definire quali aree potrebbero essere utilizzate come area di sosta da un numero più o meno cospicuo di migratori di passaggio, sia durante la migrazione di andata che in quella di ritorno.

Ci sono evidenze che anche per i siti di passaggio, così come per le aree meta, ci sia una certa fedeltà nel corso degli anni da parte di una specie.

- *Aree meta*

Sia nei confronti delle aree di svernamento che per quelle di riproduzione, gli uccelli migratori, e in particolar modo gli uccelli acquatici, hanno dimostrato un alto grado di fedeltà. Infatti una volta che i giovani hanno raggiunto la maturità sessuale e hanno scelto la loro zona di riproduzione, che nella maggior parte dei casi, salvo non si verificano fenomeni di dispersione, coincide con la zona in cui sono nati, la riconfermano gli anni successivi. Se le ragioni di tale attaccamento possono da un lato essere ricercate nella capacità innata di orientamento e riconoscimento dei luoghi da parte degli uccelli, e nel fenomeno ereditario della filopatria, dall'altro possono essere valutate sotto un profilo evolutivo. La fedeltà ad un sito, infatti, conferisce all'animale che la dimostra un vantaggio evolutivo rispetto ai conspecifici che non possiedono la medesima approfondita conoscenza del territorio. La fedeltà ai siti di riproduzione si traduce anche, per le specie acquatiche, in un pressoché costante e prevedibile numero di animali che li visitano anno dopo anno, per quanto siano possibili delle variazioni in funzione del numero di giovani nati nell'annata.

- *Zone scelte per la muta*

Molte popolazioni di uccelli acquatici, ogni anno vanno incontro al fenomeno della muta. Per tutto il periodo di tempo, variabile in termini di cadenza e durata a seconda delle specie, necessario perché si formi il nuovo piumaggio, gli animali sono sprovvisti delle piume del volo, pertanto incapaci parzialmente di procacciarsi il cibo e massimamente esposti all'azione dei predatori. Per minimizzare il rischio e aumentare le proprie possibilità di sopravvivenza, gli animali, soprattutto maschi, in

corrispondenza del periodo di muta, che generalmente corrisponde con la fine della stagione riproduttiva, si radunano in gruppi numerosi e si spostano verso tradizionali punti di aggregazione.

Questi siti sono zone estremamente localizzate e rivisitate ogni anno e vi si raggiungono densità e concentrazioni di animali elevate, come in nessun' altra situazione (Gwinner, 1990). Tutto ciò suggerisce l'importanza di questi territori come punto di incontro di numerose popolazioni di uccelli.

▪ *Aree di concentrazione e di unione*

Indipendentemente dal fatto che rappresentino zone di passaggio durante una sosta, zone scelte come sito adatto per effettuare la muta, o zone di insediamento definitivo dopo il viaggio migratorio, i territori che sono soliti ospitare grandi quantità di uccelli, anche appartenenti a specie diverse, vengono definite aree di concentrazione e di unione.

Nel caso specifico delle zone umide, le aree in cui si congregano nei vari periodi dell'anno ingenti quantità di uccelli acquatici, rappresentano zone di altissimo rischio di trasmissione e diffusione di virus aviari tra le distinte popolazioni.

Tali zone sono state classificate in relazione al numero di uccelli che ospitano ogni anno in siti primari e secondari. Per siti primari si intendono tutte le zone in cui viene regolarmente censito un numero maggiore o uguale a 20.000 uccelli acquatici, o almeno 10.000 coppie di uccelli acquatici, e riconosciute come International Bird Areas (IBAs) sulla base di criteri ornitologici quantitativi (Health e Evans, 2000). I siti secondari sono invece tutte le zone umide in cui si radunano uccelli acquatici, sulla base di quanto rilevato dal Wild Bird Database (WBDB). Le zone umide sono state distinte in relazione alla popolazione di uccelli che ospitano, ma non esistono dati precisi a proposito delle specie di uccelli acquatici che costituiscono tali popolazioni (EFSA, 2006).

Pertanto non è possibile evidenziare con precisione, non avendo dati precisi sulla distribuzione delle specie a maggior rischio di trasmissione di AI, quali delle zone rappresentino in realtà siti di raccolta ed incontro con le maggiori probabilità di

circolazione di virus influenzali.

3.2.5 Movimenti diversi dalle migrazioni stagionali

Le migrazioni non sono gli unici spostamenti effettuati dagli uccelli, al contrario esistono moltissime altre forme di movimenti che una popolazione o un individuo singolo può compiere. Per quanto riguarda spostamenti di singoli individui, è risaputo che alcuni giovani dopo il raggiungimento della maturità sessuale effettuano degli spostamenti in direzione centrifuga rispetto alla zona di nascita. Questo fenomeno è definito movimento di dispersione e distanziamento. La distanza percorsa dalla maggior parte degli uccelli è di pochi chilometri rispetto al punto di nascita, ma in altre i giovani possono disperdersi a distanze notevoli (Greenwood, 1980).

Tra i movimenti inattesi di una intera popolazione di uccelli si conoscono i fenomeni dell'irruzione, i movimenti di fuga, i movimenti di espansione.

I movimenti di irruzione della specie comprendono tutti gli spostamenti improvvisi effettuati da un gruppo di individui dalla propria zona di riproduzione ad un'altra, generalmente spinto dalla ricerca di un'area con maggiore disponibilità di cibo.

I movimenti di fuga presentano una dinamica simile a quanto esposto sopra ma la causa scatenante è la comparsa di un fattore in grado di minacciare la sopravvivenza della specie.

Infine i movimenti di espansione, determinati da un aumento della popolazione, comportano lo spostamento di gruppi numerosi di giovani alla ricerca di nuovi siti adatti. Lo spostamento riguarda sia le zone di riproduzione che di svernamento.

3.2.6 Qualità delle informazioni sulle migrazioni

Nonostante ci sia una quantità notevole di informazioni relative agli spostamenti degli uccelli selvatici, derivanti dalla lettura degli anelli metallici, come sottolineato

dall' African-Eurasian Waterbird Agreement (Dakar, 2005) manca una conoscenza precisa su scala internazionale delle migrazioni nelle diverse specie, volta ad identificare con precisione il mese esatto di arrivo di una precisa specie in un dato paese e le principali zone in cui si congregano gli animali per le soste e per la muta. Una conoscenza più ampia e sistematica a questo livello potrebbe contribuire ad evidenziare i periodi e le zone in cui il rischio di diffusione di AI virus è maggiore.

3.3 FONTE DELLE INFORMAZIONI SU CONSISTENZA E DISTRIBUZIONE DELLE POPOLAZIONI DI VOLATILI SELVATICI

3.3.1 *I censimenti*

Il censimento degli uccelli acquatici che viene effettuato ogni anno in Italia rientra in un progetto internazionale di monitoraggio della distribuzione e consistenza delle popolazioni di uccelli acquatici svernanti sul territorio europeo (*International Waterfowl Census*, IWC). I primi censimenti nazionali sono stati condotti con una certa regolarità già dal 1975 ma è solo dal 1994 che esiste un elenco unitario completo delle zone umide italiane interessate dai censimenti. Tale elenco definisce in maniera univoca i confini e la denominazione delle singole zone, proponendone una suddivisione in unità ecologiche. Anche le specie oggetto dei conteggi sono progressivamente aumentate e ora comprendono le seguenti famiglie: Gaviidae, Podicipedidae, Pelecanidae, Phalacrocoracidae, Ardeidae, Ciconiidae, Threskiornithidae, Phoenicopteridae, Gruidae, Haematopodidae, Recurvirostridae, Burhinidae, Glareolidae, Charadriidae, Scolopacidae e Laridae oltre ad anatidi e rallidi. I censimenti, coordinati a livello nazionale dall'ex Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica (ex INFS, ora ISPRA - Istituto per la Protezione e la Ricerca dell'Ambiente), vengono effettuati nel mese di gennaio perché rappresenta il periodo centrale della stagione non riproduttiva degli uccelli acquatici. Durante questo mese le specie migratrici, solitamente, si trovano nei quartieri di svernamento e sono relativamente poco mobili e aggregate, quindi più facilmente visibili; pur tuttavia nelle zone del Mediterraneo sono stati osservati regolari spostamenti verso i quartieri di nidificazione già durante questo mese e spostamenti in massa di uccelli svernanti possono verificarsi in seguito al cambiamento delle condizioni meteorologiche (Serra *et al.*, 1997). Nelle zone molto estese o in

comprensori vicini vengono condotti dei conteggi simultanei in maniera tale da evitare grossolani errori di conteggio (Baccetti *et al.*, 2002). Le specie oggetto del censimento appartengono agli uccelli acquatici intesi come gruppo polifiletico comprendente diverse specie legate all'ambiente acquatico (Baccetti *et al.*, 2002). In particolare, l'attenzione è qui incentrata sulle famiglie Anatidae e Rallidae, di cui fanno parte uccelli molto diffusi quali anatre e folaghe. Non è stata analizzata finora la diffusione in natura di individui appartenenti a forme domestiche quali anatre germanate e/o domestiche, oche domestiche, oche cignoidi e anatre mute (Baccetti *et al.*, 2002).

I censimenti degli uccelli acquatici sono inclusi nella categoria dei censimenti assoluti e, in genere, sono condotti tramite conteggio diretto degli individui presenti in una determinata area oppure, in caso di stormi di grosse dimensioni, tramite stime ottenute dal conteggio esatto di un sottoinsieme di tale stormo, riportato mentalmente su questo fino a ricavarne la totale copertura (Serra *et al.*, 1997). I valori numerici così ottenuti vengono generalmente riportati senza associare ad essi alcun errore statistico. I totali per ogni sito sono, perciò, il risultato della somma di conteggi o stime parziali e non vengono né arrotondati né in alcun modo trasformati (Bibby e Lambton, 2000; Serra *et al.*, 1997). Errori di conteggio avvengono ma essi non incidono che per il 5-10% sull'accuratezza di un censimento su larga scala, valori questi che rientrano nel range di molti altri rilevamenti effettuati in campo biologico (Serra *et al.*, 1997). Gli errori di identificazione della specie se non sono fatti in maniera sistematica e riguardano specie comuni non inficiano i totali generali e nemmeno la distribuzione degli individui su scala nazionale; di maggiore gravità sono gli errori relativi a specie rare o comuni in altri ambienti. In questi casi i dati palesemente errati vengono eliminati dalle schede di rilevazione (Serra *et al.*, 1997). Le tecniche utilizzate per il censimento non sono consone a tutte le specie di uccelli acquatici, quelle a comportamento criptico come per esempio l'alzavola (*Anas crecca*) tendono ad essere sottostimate o non rilevate. Come considerazione

di carattere generale si può ritenere che i grossi stormi tendano ad essere sistematicamente sottostimati, mentre gli uccelli numericamente meno abbondanti e ampiamente distribuiti nell'area del censimento tendano a sfuggire ad un conteggio preciso (Serra *et al.*, 1997).

I conteggi sistematici permettono una stima numerica degli uccelli acquatici presenti sul nostro territorio nazionale e consentono di individuare, in base alla loro distribuzione, eventuali siti di svernamento di importanza nazionale ed internazionale. L'Italia, infatti, dal 1976 aderisce alla Convenzione di Ramsar che ha come scopo preminente la conservazione e la gestione in maniera eco-compatibile delle zone umide. Attualmente, l'elenco, in fase di revisione, delle zone umide di importanza internazionale comprende 46 siti italiani.

Le zone umide sono identificate da un codice univoco formato dalla sigla della provincia di appartenenza seguita da una serie di numeri; vengono in tal modo individuate delle super-zone a loro volta suddivise in sotto-zone minori complete di toponimo e coordinate geografiche. Tali coordinate si riferiscono al punto centrale della zona considerata o, in caso di zone particolarmente piccole o di recente costituzione, sono state approssimate al rispettivo Comune di appartenenza (Serra *et al.*, 1997). L'elenco completo delle zone umide del Veneto comprende 379 siti dei quali solo poco più di 200 sono stati censiti con una certa regolarità. Questo perché la lista completa comprende zone umide in senso lato, alcune delle quali geograficamente poco estese e solo potenzialmente importanti dal punto di vista ornitologico. Da non trascurare anche l'aspetto operativo dei censimenti, svolti da personale molto preparato che ha conseguito l'abilitazione necessaria ma che molto spesso esegue il lavoro su base puramente volontaria. Il numero dei siti annualmente censiti varia anche in funzione delle condizioni meteorologiche durante i giorni del conteggio, la pioggia battente o la nebbia possono facilmente comprometterne i risultati. Lo sforzo di campionamento è ovviamente rivolto a mantenere costante e quanto più esteso possibile il livello di copertura dei luoghi da

censire.

Le uscite per i conteggi vengono concentrate nelle due settimane centrali del mese di gennaio; all'interno di questo periodo le conte per ogni singola zona avvengono in intervalli di tempo di 2-3 giorni a seconda dell'estensione della località presa in esame; tutto ciò al fine di minimizzare il rischio di conteggi doppi.

3.3.2 *Gli inanellamenti*

L'ISPRA è inoltre sede del Centro di Inanellamento Nazionale, deve cioè autorizzare tutti gli schemi e progetti che prevedano la cattura e la marcatura di avifauna selvatica sul territorio italiano. Ogni singolo operatore acquisisce l'abilitazione alla cattura dopo aver superato un esame pratico e teorico sul riconoscimento delle specie. Il grado di difficoltà delle prove è correlato al tipo di licenza che si vuole conseguire: esistono infatti tre tipi di patentino che vanno dal livello base, A, al livello C. Ogni tipo di licenza autorizza alla manipolazione di un determinato numero e tipo di specie. La marcatura degli uccelli catturati avviene attraverso l'apposizione ad una zampa di anelli di metallo o plastica colorata con inciso un codice numerico. Ogni Paese ha un proprio codice identificativo e usa un particolare colore. Al momento della cattura viene compilata una scheda contenente le misure biometriche degli individui presi che variano a seconda della specie di appartenenza, data e luogo di cattura, numero di operatori, condizioni meteorologiche ed eventuali note di interesse. La procedura rimane la stessa anche in caso di catture di animali già marcati; la ricattura viene ovviamente segnalata come tale sulla scheda.

Le schede, una volta informatizzate, vanno a costituire un enorme database coordinato a livello europeo dall'EURING; tutti gli stati europei contribuiscono al mantenimento di questa banca dati inviando le informazioni su animali catturati, ricatturati o avvistati sul proprio territorio.

L'EURING Data Bank dislocata ad Heteren (NL) fornisce una solida base per tale

conoscenza. Dal 2004 sono accessibili (<http://www.euring.org/edb/index.htm>) anche informazioni e carte del paleartico che riportano dati di inanellamento o di ricattura per molte specie.

In ogni paese esistono vari programmi o schemi di inanellamento volti a monitorare la fauna ornitica e che prevedono catture sistematiche di individui perlopiù adulti o di pulli in caso di specie nidificanti. I dati sulle ricatture provengono sia da animali effettivamente presi o avvistati più volte sia da ritrovamenti accidentali di anelli, recuperati soprattutto da animali abbattuti in caso di specie oggetto di attività venatoria e che i cacciatori o chiunque altro li ritrovi sono tenuti a restituire all'ISPRA.



Fig. 8 - Inanellamento e registrazione delle misure biometriche (INFS, 2005)

Le catture di anatidi si effettuano con l'utilizzo di trappole fisse piazzate in zone frequentate dagli animali. Gli uccelli possono essere attirati mettendo dei soggetti vivi all'interno della trappola stessa oppure con degli stampi all'esterno; sia che si usino richiami vivi o meno l'invito ad entrare è costituito principalmente dal cibo: granaglie sparse in abbondanza nei dintorni del sito. L'entrata della trappola funziona un po' come una nassa e l'animale una volta entrato non riesce più ad

uscire. E' indubbio che rispetto ad altre famiglie di uccelli per le quali sono sufficienti delle reti apposite (*mist nets*) la cattura degli anatidi richiede uno sforzo organizzativo e una dedizione maggiore, non fosse altro per il continuo controllo e la costante pasturazione della trappola. Essendo inoltre specie per la maggior parte cacciabili, risulta molto difficile reperire luoghi idonei dove l'aggregazione di un numero consistente di animali non venga sfruttata a fini venatori.



Fig. 9 - Trappola Abberton per la cattura di anatidi

(Fonte: <http://www.anserproject.it>)

Proprio per questi motivi non sono mai stati portati avanti progetti a lungo termine che abbiano interessato gli anatidi, se non per periodi limitati di tempo e grazie alla disponibilità di qualche Oasi o Azienda Faunistico-Venatoria.

I dati riguardanti le ricatture possono dare un'indicazione su una parte degli spostamenti effettuati da determinate popolazioni di uccelli ma vanno ovviamente utilizzati assieme ad altre conoscenze derivanti dai dati di presenza o assenza di una determinata specie, dalla sua distribuzione e consistenza e tutto questo può essere ottenuto solo attraverso programmi di monitoraggio dell'avifauna acquatica costanti nel tempo che permettano il campionamento di un numero sufficiente di individui.

PARTE IV
LA SORVEGLIANZA DELL'INFLUENZA AVIARE
NEI VOLATILI SELVATICI

4.1 LA SORVEGLIANZA NEL MONDO

4.1.1 *Verso una sorveglianza globale*

A seguito dell'emergenza innescata dalla diffusione del virus altamente patogeno dell'influenza aviaria H5N1 (HPAI H5N1), il mondo negli ultimi anni è in uno stato di allerta per frenare la diffusione della malattia e ridurre il rischio di una potenziale pandemia umana. Sistemi internazionali di allarme rapido, che fanno capo all'*Office Internazionale des Epizooties* (OIE), all'Unione europea, all'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), ed alla *Food and Agriculture Organization* (FAO), compiono un monitoraggio attivo della situazione dell'influenza aviaria in tutto il mondo. La FAO, attraverso la sua *Emergency Prevention System* per la sorveglianza delle malattie transfrontaliere degli animali e delle piante (TAD) e delle malattie del programma EMPRES e la *Global Animal Health Information System* (EMPRES-I), ha giocato un ruolo chiave nella raccolta, registrazione e analisi dei dati in merito all'influenza aviaria, sia in popolazioni di uccelli selvatici sia nel pollame domestico. Il sistema ha lo scopo di fornire ai paesi membri e alle istituzioni partner aggiornamenti tempestivi sulla situazione epidemiologica e l'analisi dei rischi (*AIDE News*, EMPRES, malattie della *Tracking List*). L'entità della crisi e le caratteristiche epidemiologiche del virus HPAI H5N1 hanno spinto la comunità scientifica ad adottare un approccio multidisciplinare attraverso la mobilitazione immediata di competenze e la collaborazione di veterinari, specialisti della fauna selvatica, ornitologi, virologi, biologi molecolari, gestori dei dati, e specialisti dei sistemi informativi cartografici (GIS). L'emergenza dell'influenza aviaria rappresenta un'opportunità unica per sviluppare nuovi rapporti di collaborazione tra i gruppi e le istituzioni. Lo scambio di informazioni e conoscenze porta ad una migliore comprensione dei fattori epidemiologici ed ecologici che governano l'insorgenza e la diffusione della malattia. La comunità scientifica internazionale è chiamata ad unire gli sforzi per semplificare la condivisione di

grandi quantità di dati, uniformare i sistemi di sorveglianza, effettuare le valutazioni dei rischi, e coordinare le attività attraverso sistemi informativi.

In conclusione, l'obiettivo finale dei sistemi di allerta precoce è quello di rendere le informazioni e i risultati a disposizione di tutte le parti interessate e di fornire la possibilità di approntare una reazione tempestiva con il miglior rapporto tra efficacia e costi.

Tutti i dati provenienti dalle attività di sorveglianza degli uccelli selvatici devono essere gestiti, integrati, analizzati e resi accessibili, preferibilmente attraverso una piattaforma comune in cui i dati possono essere visualizzati e scambiati. L'integrazione dei dati, l'analisi e la mappatura rappresentano un passo fondamentale per comprendere la distribuzione, il comportamento, l'origine e l'evoluzione di una malattia, e alla definizione dei costi del caso di risposta delle malattie. Per affrontare questa sfida globale, è necessario rafforzare le opportunità di collaborazione tra le parti coinvolte e permettere un accesso rapido ai dati ricavati dalle attività di sorveglianza. A questo scopo i programmi di sorveglianza nazionali devono essere collegati ad iniziative già esistenti (GLEWS, GAINS, *Birdlife International*, *Wetlands International*, CIRAD, Unione europea).

4.1.2 Progetti internazionali in corso

Nel 1994 la FAO ha lanciato il programma EMPRES (<http://www.fao.org/AG/AGAINFO/programmes/en/empres/home.asp>). Per supportare il sistema di allerta precoce, è stato sviluppato. EMPRES-I (*Web-based Global Animal Health Information System*) che mette a disposizione una piattaforma per condividere le informazioni tra gli organismi ufficiali di polizia sanitaria e la FAO, nonché con i consulenti, gli esperti e le istituzioni coinvolte nella gestione del focolaio di malattia e nella risposta all'emergenza. Il nucleo del sistema è un database Oracle disponibile in rete. Agli utenti sono permessi diversi livelli di accesso al sistema (ospite, manager, amministratore) e diversi livelli di

servizi (visualizzazione, modifica, analisi). EMPRES-I è stato progettato per la registrazione e l'analisi dei dati della sorveglianza sulle malattie animali transfrontaliere più importanti (TAD). Malattie prioritarie sono definite l'influenza aviaria altamente patogena (HPAI), l'Afta (FMD), la febbre della Valle del Rift (RVF), la pleuropolmonite contagiosa dei bovini (CBPP), la peste suina africana (ASF), e la peste bovina (RP).

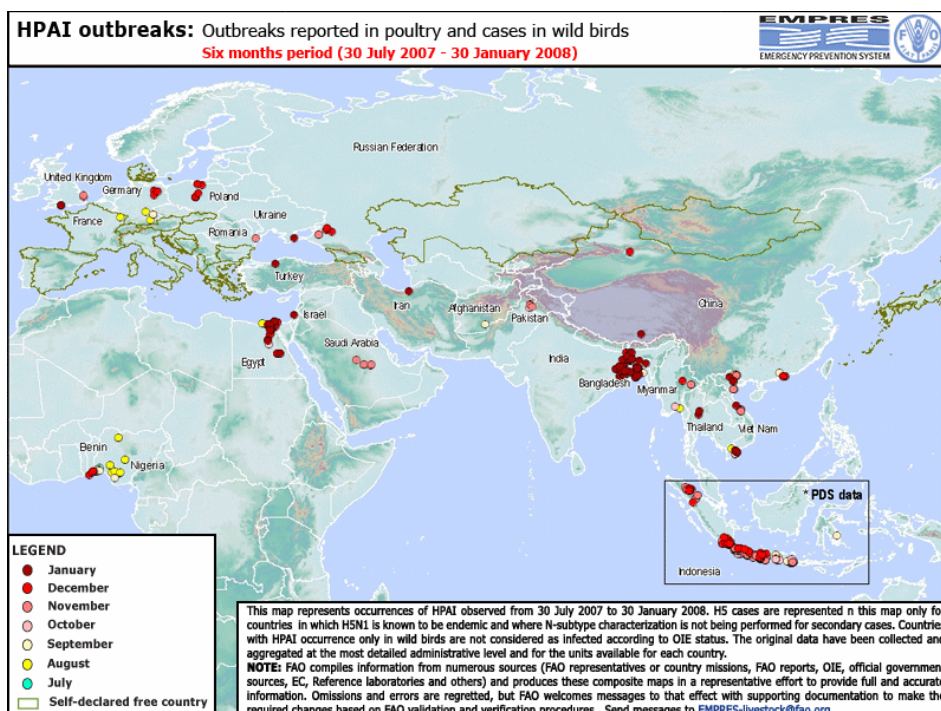
Fin dall'inizio della crisi dell'influenza aviaria nel 2003/2004, sono state registrate tutte le informazioni disponibili sui focolai verificatisi nel pollame domestico e nei volatili selvatici. Le informazioni vengono raccolte da varie fonti, e siti Web ufficiali come quello dell'OIE, dell'OMS e del Ministero delle Politiche Agricole le pubblicano regolarmente in rete. Inoltre, alcune informazioni sono fornite direttamente dalla Commissione europea o dai governi, oltre che dalle postazioni sul campo della FAO e dai laboratori di riferimento FAO/OIE. In aggiunta a queste fonti ufficiali, altri dati sono ricavati da mailing list, come *Promed-Mail*, *GPHIN*, o *AI-Watch*.

EMPRES-I quindi fornisce aggiornamenti tempestivi e accurati sulle emergenze epidemiologiche, nonché l'analisi dei rischi per le TAD (la tracking list delle malattie è un esempio di elaborazione delle informazioni generate da EMPRES-I).

Parlando di influenza aviaria EMPRES-I produce una sintesi quindicinale della situazione epidemiologica nello spazio e nel tempo, segnalando tutti i focolai confermati e in attesa di indagini in tutto il mondo nel pollame domestico e nei volatili selvatici, e visualizzando l'evoluzione temporale dell'incidenza giornaliera dell'infezione per un periodo di 1 anno.

EMPRES-I è stato collegato ad un sistema globale di informazione geografica (GIS) di per fornire una rappresentazione visiva dei modelli di distribuzione della malattia e per esplorare i rapporti tra geografia, ambiente, e malattia. L'ambiente GIS può contribuire in modo significativo alla comprensione dei fattori epidemiologici ed ecologici responsabili della comparsa e della diffusione di HPAI. Nel quadro GIS i dati epidemiologici possono essere integrati da altri dati quali l'utilizzo del suolo, la

densità di pollame, la distanza tra focolai, e altre variabili che possono essere rilevanti per l'epidemiologia delle malattia. Un'analisi esplorativa di dati spaziali (ESDA) viene utilizzata per elaborare modelli matematici utili all'individuazione di cluster di casi o di aree con elevata incidenza, ad evidenziare l'associazioni tra la comparsa della malattia e altri fattori di rischio, e ad identificare aree più esposte.



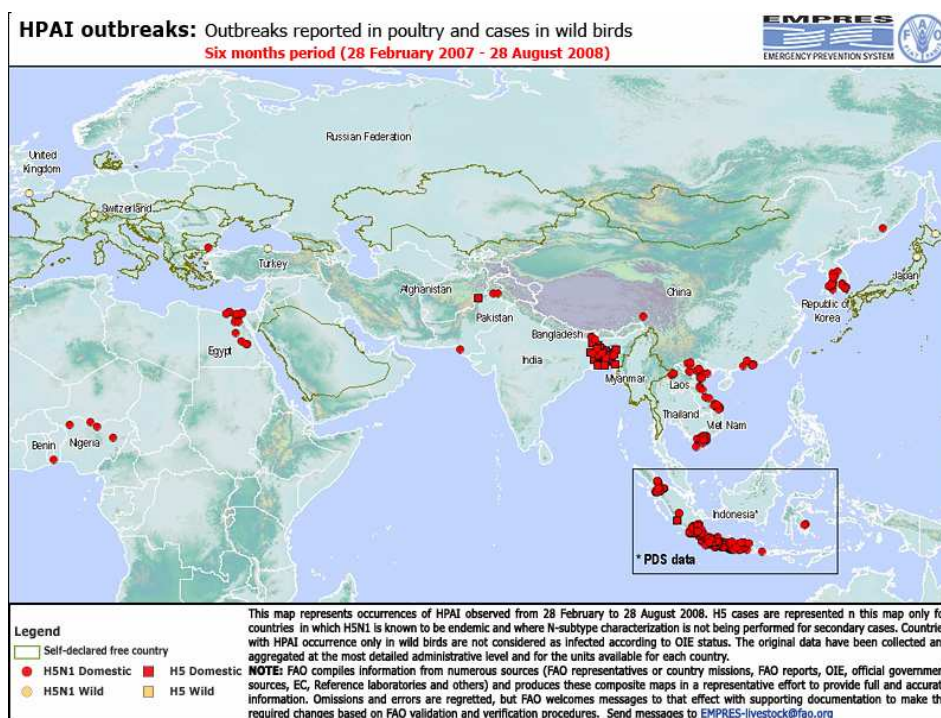


Fig. 10 e 11 Esempio di mappe messe a disposizione sul sito FAO-EMPRES con localizzazione dei focolai confermati in volatili domestici e selvatici in un periodo di 6 mesi (Fonte: http://www.fao.org/AG/AGAINFO/programmes/en/empres/maps_new.html)

L'ECTAD HPAI è una pubblicazione on-line che raccoglie informazioni sui focolai sospetti e confermati o sulla diffusione della malattia nel corso delle 2 settimane precedenti. Informazioni dal campo e fornite da organizzazioni e istituzioni vengono modificate e riassunte per dare al lettore una breve panoramica di eventi più importanti. La prima pagina offre una mappa che mostra le località dei focolai di HPAI confermati nel pollame e negli uccelli selvatici per un periodo di 2 mesi. L'aggiornamento viene prodotto e pubblicato in formato elettronico tre volte alla settimana ed è stato originariamente creato per aggiornare regolarmente gli ufficiali della FAO sulla situazione dell'infezione HPAI nel mondo. In linea con la crescente domanda, la sua distribuzione è stata estesa agli uffici nazionali della FAO, punti di contatto tra diverse organizzazioni internazionali, e alle istituzioni partner.

Il mensile della FAO sull'emergenza dell'influenza aviaria (AIDE News) è stato

progettato appositamente per la distribuzione pubblica. Esso comprende una breve analisi della situazione epidemiologica per quanto riguarda i focolai confermati, e le informazioni sulle missioni e sui progetti della FAO.

Nel giugno 2006 la *Wildlife Conservation Society* (US) lancia il progetto '*Global Avian Influenza Network for Surveillance*' (GAINS), un esempio di collaborazione internazionale e multi-disciplinare utile alla raccolta e alla condivisione di informazioni in materia di influenza aviaria altamente patogena (HPAI) H5N1, così come di altri ceppi, negli uccelli selvatici. GAINS utilizza tecnologie dell'informazione e della comunicazione (Information and Communication Technology, ICT) al fine di:

- migliorare la raccolta, il coordinamento e la diagnosi di laboratorio di campioni prelevati da volatili selvatici per individuare la distribuzione dei virus influenzali;
- studiare l'evoluzione genetica del virus;
- migliorare le conoscenze sulla distribuzione e sui movimenti migratori degli uccelli selvatici;
- sviluppare un sistema di allerta rapido per la diffusione globale dei virus HPAI per tutelare la salute del pollame, la salute umana e la biodiversità.

L'obiettivo di questa iniziativa è di controllare la diffusione dell'influenza aviaria e prevenire l'insorgenza di focolai attraverso un sistema di monitoraggio e di sorveglianza globali in grado di raccogliere dati, ampliare le conoscenze sull'epidemiologia dell'infezione, condividere le informazioni a diversi livelli (governi, organizzazioni internazionali, enti pubblici e privati) e facilitare lo sviluppo di risposte alla minaccia di epidemie.

I presupposti su cui si basa il progetto sono quelli della condivisione delle conoscenze a supporto del processo decisionale, della collaborazione tra partners, laboratori di riferimento, enti e agenzie coinvolti a livello locale, nazionale e internazionale e del potenziamento delle capacità tecniche degli operatori locali,

attraverso contributi tecnico-scientifici e un sito web (<http://www.gains.org>) che permette il libero accesso alla consultazione di mappe interattive, dei risultati della sorveglianza, di report e pubblicazioni scientifiche, oltre alla possibilità di contribuire al database ed accedere ad un forum.

Il progetto NEW FLU BIRD (NFB, <http://www.new-flubird.eu/>) è coordinato da 10 partners in tutta Europa, tra i quali Wetlands International ed Erasmus. Il progetto NFB si propone di creare una rete di allerta precoce dei virus influenzali negli uccelli migratori in Europa, fornendo dati e conoscenze sulle specie di uccelli ad alto rischio, coordinando la sorveglianza nei luoghi ad alto rischio e sviluppando la capacità di monitoraggio degli uccelli acquatici.

Una finalità è quella di fornire una rete di conoscenze sulle rotte migratorie (volume e tempi di migrazione, movimenti delle specie ad alto rischio, ecc.), impostare il campionamento sistematico di uccelli migratori sani e coordinare un sistema di monitoraggio della mortalità aviaria. Tutti i dati vengono rielaborati in un sistema di allarme e di valutazione del rischio, raccogliendo le competenze di esperti virologi, epidemiologi e ornitologi.

OFFLU (<http://www.offlu.net>) è la rete di competenze congiunta OIE-FAO in materia di influenza aviaria, istituita nel 2005 per sostenere gli sforzi internazionali di monitoraggio e controllo delle infezioni da virus influenzali nel pollame e in altre specie di uccelli, e per condividere i risultati del campionamento e i dati epidemiologici necessari ad implementare l'attività di prevenzione e lo sviluppo precoce di vaccini. OFFLU rafforza i legami esistenti all'interno della rete sanitaria internazionale e collabora con il sistema di monitoraggio dell'influenza dell'Organizzazione Mondiale della Sanità su tutte le questioni rilevanti per la salute pubblica. Gli intenti di OFFLU comprendono lo scambio di dati scientifici e materiali biologici (inclusi i ceppi del virus) all'interno della rete, l'analisi di tali dati e la condivisione delle informazioni con la comunità scientifica internazionale.

Inoltre gli esperti di OFFLU forniscono consulenza tecnica, formazione e competenze scientifiche ai Paesi membri per contribuire alla prevenzione, alla diagnosi, alla sorveglianza e al controllo dell'influenza aviaria.

4.1.3 *Early warning, Early detection*

Studiare l'evoluzione di una malattia con un approccio volto al controllo e all'eradicazione significa perseguire il fine di limitare al massimo la diffusione dell'infezione mediante strategie utili ad individuare il più precocemente possibile ed eradicare l'infezione. Indispensabile a questo scopo è sviluppare e uniformare la definizione di caso primario e di caso secondario. Definiamo caso primario l'introduzione per la prima volta di un agente infettivo in un Paese, o in una Regione. I casi secondari vengono invece definiti dal numero di focolai che si sviluppano a seguito dell'introduzione dell'infezione in un Paese/Stato/Regione. Rispetto al caso primario, lo scopo è quello di identificarlo nel più breve tempo possibile, proprio per ridurre il numero di casi secondari che da esso potenzialmente possono svilupparsi. L'azione da intraprendere in presenza di casi secondari è, viceversa, la loro eliminazione nel più breve tempo possibile, così da limitare la diffusione dell'infezione. Quindi il caso primario deve essere trovato velocemente, i casi secondari altrettanto velocemente ed efficacemente gestiti.

In questa visione le strategie di controllo ed eradicazione di una malattia, nelle quali i sistemi di sorveglianza rivestono un ruolo fondamentale, si concretizzano in una sorta di gara di velocità, nella quale gli sforzi di controllo ed eradicazione si valutano su una scala temporale e sono mirati alla riduzione dei periodi ad alto rischio. Definiamo due periodi ad alto rischio.

Il primo periodo ad alto rischio (*First High Risk Period, HRP1*) è il periodo che intercorre tra l'introduzione dell'infezione in un Paese e la prima diagnosi di infezione. La lunghezza dell'HRP1 dipende dallo stato di allerta, dalle capacità e dalle motivazioni di allevatori, veterinari del servizio pubblico e privati e

dall'efficienza diagnostica dei laboratori coinvolti, come anche dalla virulenza dell'agente eziologico.

Nelle due tabelle che seguono vengono riportati esempi di ritardo (*time lag*) tra il verificarsi del primo caso di malattia e la segnalazione all'OIE per quanto riguarda l'infezione da virus HPAI in Paesi extra-europei (Tab. 1) e da Peste Suina Classica (CSF) in Europa e nel mondo (Tab. 2)

Tab. 1 - Time lag tra primo focolaio di influenza aviare HPAI H5N1 e notifica all'OIE

Paese	Data della prima segnalazione di mortalità	Data della prima notifica all'OIE	Time lag (giorni)
Nigeria	10 Gennaio	8 Febbraio	29
Niger	13 Febbraio	28 Febbraio	15
Cameroon	21 Febbraio	11 Marzo	18
Burkina Faso	1 Marzo	4 Aprile	34
Costa d'Avorio	30 Marzo	25 Aprile	26
Bangladesh	22 Febbraio	22 Marzo	29

Tab. 2 - Time lag tra introduzione di PSC e notifica del primo caso (HRP)

Paese	Anno	HRP (settimane)
UK	1986	4
Olanda	1992	6
Belgio	1993	3
Germania	1997	8
Olanda	1997	6
Spagna	1997	9
UK	2000	8
Iran Java	2004	>12
Papua Nuova Guinea	2004	>16
Germania	2006	10

Il secondo periodo ad alto rischio (HRP2) viene definito come il periodo che intercorre tra il momento in cui il primo animale viene diagnosticato come infetto e l'attuazione delle misure intraprese per prevenire la diffusione dell'infezione (abbattimento, definizione delle aree di protezione e di sorveglianza, ecc..).

L'*EARLY WARNING* consiste nel piano strategico sviluppato per ridurre la durata del primo periodo ad alto rischio (HRP1), ed ha come obiettivo la preparazione del servizio sanitario a reagire prontamente alla potenziale presenza di infezione, riducendo così l'insorgenza di casi secondari. Componenti essenziali dell'*EARLY WARNING* sono lo scambio e la condivisione delle informazioni soprattutto a livello internazionale, una chiara catena di comando (chi deve fare cosa), una chiara, possibilmente ufficializzata da un documento scritto, strategia gestionale dell'emergenza.

Nel caso dell'emergenza da influenza aviaria HPAI la strategia prevede:

- una fase di allerta in caso di particolari condizioni epidemiologiche del virus HPAI in Paesi confinanti o con i quali si intraprendono scambi commerciali;
- l'informazione continua di tutti i componenti del servizio sanitario e veterinario;
- acquisizione di conoscenze sulla malattia;
- training specifico indirizzato alla formazione degli operatori per il riconoscimento precoce dell'infezione;
- aumento dell'attenzione da parte degli allevatori di pollame;
- aggiornamento continuo del Piano Nazionale di monitoraggio dell'HPAI;
- mantenimento della fase di allerta dei laboratori e disponibilità immediata dei test diagnostici;
- pronto conferimento dei campioni sospetti da parte delle autorità competenti ai Laboratori di Referenza.

Intendiamo con *EARLY DETECTION* l'insieme delle misure messe in atto per

ridurre il più possibile la durata del secondo periodo ad alto rischio (HRP2). Lo scopo è quindi quello di identificare precocemente la presenza dell'infezione per limitare la diffusione della malattia, e quindi i casi secondari. Le componenti dell'*EARLY DETECTION* sono la conoscenza della malattia (da parte di veterinari ed allevatori), la definizione di caso e l'allestimento di un flusso informativo.

Di seguito (tabelle 3, 4 e 5) vengono riportati i diversi gradi di probabilità di identificare l'infezione in varie condizioni epidemiologiche a seconda che l'oggetto dell'*EARLY DETECTION* siano volatili selvatici, allevamenti rurali o allevamenti intensivi di pollame.

Tab.3 - Probabilità di identificazione di un caso positivo in volatili selvatici

<i>Altamente probabile</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Legame noto a focolai confermati in pollame o uomo - La mortalità coinvolge specie ad alto rischio di anatidi (HRS) con > 10 animali trovati morti in una settimana nella stessa località - Singoli cigni trovati morti
<i>Probabile</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Mortalità in molti (>20) uccelli di una sola specie entro un raggio di 10 Km da una zona umida - Mortalità in uccelli sinantropici che coinvolge > 20 individui entro un raggio di 10 Km da una zona umida - Mortalità osservata anche in cani, gatti e carnivori selvatici come volpi o rapaci
<i>Improbabile</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Un singolo uccello trovato morto in un'area urbana al di fuori delle rotte migratorie - Un singolo uccello non appartenente alle specie ad alto rischio trovato morto in una località qualsiasi - Mortalità solo in uccelli (song birds), né anatidi né rapaci

Tab. 4 - Probabilità di identificazione di un caso positivo in allevamenti rurali

<i>Altamente probabile</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Mortalità in molti polli domestici nella stessa area (> 20) - Mortalità in diverse specie di volatili domestici compresi anatre e/o oche
-----------------------------------	--

	<ul style="list-style-type: none"> - Coinvolgimento di diversi allevamenti con alta mortalità (> 50%) - Un allevamento con > 5 uccelli morti e alta mortalità (> 80%) con limitata possibilità di diffusione ad altri allevamenti - Bassa mortalità ma stretto legame con altri casi confermati in pollame, uccelli selvatici o uomo - Mortalità osservata anche in cani, gatti o carnivori selvatici come volpi o rapaci
<i>Probabile</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Diversi allevamenti coinvolti ma mortalità < 50% - Singolo allevamento infetto con meno di 5 ma > 50% degli uccelli morti entro un breve arco di tempo e una forte probabilità di introduzione del virus - Singolo allevamento infetto con meno di 5 ma > 80% degli uccelli morti entro una settimana
<i>Improbabile</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Uno o due uccelli morti e mortalità < 50% senza contatti con uccelli malati o selvatici né recente introduzione di animali vivi in allevamento - Mortalità osservata diversi giorni prima senza che ci sia stata diffusione ad allevamenti vicini in assenza di misure di protezione

Tab. 5 - Probabilità di identificazione di un caso positivo in allevamenti commerciali

<i>Altamente probabile</i>	- Mortalità > 10% in 24 h con segni di malattia in altri uccelli compatibili con HPAI
<i>Probabile</i>	- Mortalità 2-10% in 24 h
<i>Improbabile</i>	- Capacità di ingestione di cibo e acqua ridotta del 20% per un giorno, o mortalità del 10% per 2 giorni

Un sistema di controllo efficiente per influenza aviaria HPAI dovrebbe comprendere diverse fasi di allerta e risposta in relazione alla situazione epidemiologica che ci si trova ad affrontare:

- “tempo di pace”: HPAI non è presente in nessun Paese confinante o partner commerciale. Le azioni da intraprendere comprendono: l’elaborazione di un quadro legislativo specifico; il mantenimento di un livello base di formazione degli operatori e di capacità diagnostica dei laboratori; il monitoraggio continuo della situazione epidemiologica internazionale; la programmazione di corsi di aggiornamento per i servizi veterinari a cadenza almeno quadriennale.
- “allerta internazionale”: il virus HPAI viene identificato in Paesi confinanti o partner commerciali. Le azioni da intraprendere comprendono: aggiornamento e diffusione della definizione di caso agli operatori coinvolti; implementazione delle misure di biosicurezza in popolazioni, compartimenti e aree a rischio; miglioramento dell’efficienza diagnostica dei laboratori e della rete di connessione con i laboratori internazionali di riferimento; formazione ed allerta dei veterinari pubblici e privati, in particolare per quanto riguarda le corrette modalità di conferimento dei campioni; fornitura a livello locale del materiale necessario alle attività di campionamento.
- “caso sospetto” : i rilievi clinici, anatomo-patologici o i risultati dei test di laboratorio coincidono con la definizione ufficiale di “caso”. Le azioni da intraprendere comprendono: immediata allerta dei servizi veterinari e dei laboratori; campionamento e conferimento dei campioni al laboratorio di riferimento; blocco della movimentazione degli animali. I laboratori dovranno in prima istanza escludere la presenza di virus HPAI, in seguito ricercare altre malattie contagiose con segni clinici sovrapponibili (ad esempio la Newcastle disease), ed in ultimo diagnosticare la causa di malattia/mortalità.

- “caso confermato”: la diagnosi di laboratorio conferma la presenza di HPAI. Le azioni da intraprendere comprendono: identificazione di aree infette e di aree di sorveglianza; *stampig out*; disinfezione; notifica internazionale; indagine epidemiologica; sviluppo di uno schema di sorveglianza.

4.1.4 La sorveglianza in Europa

Dal 1961 quando è stato segnalato il primo isolamento di virus aviari ad alta patogenicità (HPAI) in uccelli selvatici in Sud Africa, ormai quasi 45 anni fa, e da quando in relazione all’epidemia di H5N1 HPAI in Asia sono stati riportati con maggiore frequenza casi H5N1 HPAI negli uccelli selvatici, le segnalazioni di infezioni da HPAI nelle popolazioni selvatiche sono state estremamente limitate e collegate a focolai nel pollame domestico. Invece, dall’inizio dell’epidemia da H5N1 in Asia le segnalazioni di infezioni da questo sottotipo negli uccelli selvatici sono diventate sempre più frequenti.

La finalità principale della sorveglianza negli uccelli selvatici condotta nell’Unione Europea prima dell’emergenza dell’epidemia da H5N1 HPAI in Asia era l’identificazione dei virus LPAI sottotipi H7 e H5 che, infettando il pollame, potevano potenzialmente portare allo sviluppo di virus ad alta patogenicità.

La prima indagine ufficiale dell’EU (al tempo composta da 15 Stati membri) sull’influenza aviare negli uccelli selvatici è stata condotta su base volontaria a seguito della Decisione della Commissione 2002/649/EC, benché la sorveglianza sugli uccelli selvatici era in essere prima di allora in diversi Stati membri. In quell’anno 11 Paesi parteciparono all’indagine seguendo le linee guida dell’Unione che indicavano un monitoraggio mirato per un 70% agli anatidi migratori, per un 20% a limicoli ed il restante 10% ad altre specie. Lo scopo di un piano di sorveglianza così strutturato era quello di supportare un sistema di pre-allerta per l’introduzione del virus negli allevamenti di pollame, nonché di implementare le

conoscenze sulla reale gravità della minaccia costituita dall'influenza aviaria per la salute degli animali.

Nel 2005 è stata adottata dalla Commissione europea la Decisione 2005/464/CE che rivedeva le linee guida esistenti aggiungendo ulteriori raccomandazioni, come la necessità di focalizzare il campionamento sugli uccelli migratori nel periodo autunno-invernale. A causa dell'evoluzione dell'epidemia H5N1 in Asia, è stato deciso di intensificare la sorveglianza sugli uccelli selvatici con una modifica contenuta nella decisione 2005/726/CE, che riporta linee guida più specifiche riguardo la sorveglianza attiva e passiva, ed un approccio basato sul rischio che individua le specie di uccelli selvatici a più alto rischio sulla base della loro origine, delle rotte migratorie, e della probabilità di contatto con il pollame domestico. Inoltre si indirizza il campionamento nelle aree di aggregazione dell'avifauna migratoria, in prossimità di allevamenti di pollame o situate lungo le rotte migratorie. In quest'occasione è stata compilata una lista provvisoria di 15 specie di uccelli selvatici che presentano un rischio più elevato di esposizione ai virus influenzali, destinata ad essere aggiornata negli anni successive alla luce di nuove prove scientifiche, ed introdotta la modalità di campionamento da uccelli trovati morti.

Con l'adozione della decisione 2006/101/CE, nel febbraio 2006, la sorveglianza dei volatili selvatici, fino ad allora condotta su base volontaria, diventa obbligatoria. La decisione conferma le linee guida per la sorveglianza descritte nella decisione 2005/464/CE, ed afferma l'inapplicabilità della sorveglianza sierologica negli uccelli selvatici.

Nel 2006, la raccolta di informazioni è stata ampliata ed organizzata consentendo un'analisi più dettagliata rispetto agli anni precedenti. Inoltre, è stato istituito un Gruppo di lavoro europeo per la sorveglianza dell'influenza aviaria in uccelli selvatici con lo scopo di discutere i risultati del piano di sorveglianza e migliorare l'analisi dei dati, così da fornire informazioni sull'epidemiologia dell'infezione e di conseguenza indirizzare la sorveglianza su specie e aree bersaglio.

Nel maggio 2006 la European Food Safety Authority (EFSA) ha prodotto un elenco aggiornato delle specie a rischio (EFSA, 2006, documento della Commissione SANCO/10268/2006 Rev.5).

La selezione è stata effettuata tra tutte le specie migratorie, appartenenti alle famiglie *Anatidae* e *Charadriiformes*, presenti in Europa almeno per un periodo dell'anno. Nella costituzione dell'algoritmo necessario per l'identificazione delle specie sono state prese in considerazione caratteristiche comportamentali ed ecologiche che potessero fungere da fattori di rischio. In una prima fase sono state considerate potenzialmente a rischio tutte le specie che dimostrassero un certo grado di incontro e unione con altre specie, e una tendenza gregaria nel corso della migrazione e del periodo di svernamento. Successivamente sono state incluse nella lista specie che non riconoscessero come habitat elettivo zone marine, litorali costieri e saline, in quanto, in questo caso, il rischio di entrare in contatto con pollame risulta piuttosto basso. L'ultimo filtro applicato alla selezione considerava il passaggio degli uccelli attraverso zone extra europee in cui si siano verificati focolai sostenuti dall' H5N1. In Appendice I sono riportate le tabelle relative al risultato della selezione.

L'elenco, non esaustivo, è destinato unicamente a individuare le specie migratorie che possono comportare un rischio più elevato sotto il profilo dell'introduzione dell'influenza aviaria nella Comunità, in ragione dei loro modelli migratori che interessano zone in cui si è registrata l'HPAI, sottotipo H5N1, nel pollame o nei volatili selvatici. Si fonda sul parere scientifico relativo agli uccelli migratori e al loro possibile ruolo nella diffusione dell'influenza aviaria ad alta patogenicità, adottato il 12 maggio 2006 dal gruppo di esperti scientifici sulla salute e sul benessere degli animali dell'EFSA e sui lavori condotti dal comitato ORNIS e da consulenti esterni della direzione generale dell'Ambiente della Commissione europea, e anche sulla base dei risultati della valutazione dei rischi.

In Appendice I viene inoltre riportato l'elenco delle specie di volatili selvatici che vivono in prossimità del pollame domestico, quindi potenzialmente in grado di

trasmettere il virus H5N1 al pollame attraverso volatili selvatici infetti in forma asintomatica («specie ponte»). Anche questo elenco si fonda sul parere scientifico relativo agli uccelli migratori e al loro possibile ruolo nella diffusione dell'influenza aviaria ad alta patogenicità, adottato il 12 maggio 2006 dal gruppo di esperti scientifici sulla salute e sul benessere degli animali dell'EFSA e sui lavori condotti dal comitato ORNIS e da consulenti esterni della direzione generale dell'Ambiente della Commissione europea. La direzione generale dell'Ambiente ha, in particolare, incaricato *Wetland international* e EURING di esaminare, aggiornare e ampliare l'indagine preliminare sulle specie e sui siti a più alto rischio alla luce dei focolai di H5N1 manifestatisi in Europa, e di individuare altre specie di volatili ad alto rischio che potrebbero agire quali «specie ponte» tra i volatili selvatici e il pollame e/o l'uomo in varie parti d'Europa.

La metodica e l'efficacia dei diversi programmi di sorveglianza condotti negli SM sono molto diversificati per differenze nel metodo di campionamento, nell'importanza relativa della sorveglianza attiva rispetto a quella passiva come nel numero effettivo degli uccelli campionati. Le diversità riscontrate nei programmi e la registrazione di dati aggregati possono avere un notevole impatto sull'interpretazione dei risultati. In linea generale negli Stati membri sono stati attuati tre tipi di sorveglianza degli uccelli selvatici:

- sorveglianza attiva, focalizzata sulla cattura di volatili vivi, la maggior parte delle volte mirata su specie e/o aree ad alto rischio
- sorveglianza passiva, incentrata sul monitoraggio dell'aumento della morbilità e della mortalità;
- sorveglianza di animali sentinella, il più delle volte utilizzando anatre allevate in aree ad alto rischio sottoposte a controlli regolari.

4.1.5 Il piano di monitoraggio nazionale

Il sistema di sorveglianza nazionale per il controllo dell'Influenza aviaria, allineandosi con le linee guida elaborate in ambito comunitario, è stato rafforzato a seguito dell'evoluzione della situazione sanitaria relativamente ai casi di infezione da virus dell'Influenza aviaria nel Sud Est asiatico, nonché a seguito del coinvolgimento di alcune aree confinanti al territorio comunitario (Russia, Kazakhstan, Turchia).

Infatti, già a partire dal 2003 le Autorità sanitarie veterinarie hanno intensificato il monitoraggio nelle zone ad alta vocazione avicola, maggiormente a rischio di contagio, per estendere nel 2004 la sorveglianza a tutto il territorio nazionale.

Il Piano di monitoraggio per il controllo dell'Influenza aviaria predisposto di concerto con il Centro di referenza per l'Influenza aviaria (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie) e l'ex Istituto Nazionale della Fauna Selvatica, ora Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), è stato implementato a partire dal 22 settembre 2005 con nota DGVA. VIII/33823 su tutto il territorio nazionale al fine di garantire una sorveglianza regolare sul pollame domestico, con particolare riferimento agli allevamenti all'aperto (*free range*) ed a *management* potenzialmente a rischio, nonché sui volatili selvatici.

La sorveglianza sulle popolazioni selvatiche prevede il controllo delle zone umide del territorio nazionale individuate in base ad un'attenta analisi del rischio (ubicazione lungo le rotte migratorie, alta densità di allevamenti di pollame).

Le aree maggiormente interessate dal piano sono state individuate in base ai parametri di seguito elencati:

- siti di svernamento del germano reale;
- aree densamente popolate (DPPA);
- regioni coinvolte nelle epidemie di influenza aviaria.

Gli obiettivi del Piano di sorveglianza dell'influenza aviaria nei volatili selvatici comprendono:

- Attuare un programma di sorveglianza attiva e passiva nelle specie migratorie (svernanti e di passo) ed in aggiunta nelle specie stanziali nidificanti nelle zone umide del territorio nazionale.
- Determinare la prevalenza e le caratteristiche biologiche dei virus influenzali isolati dalle popolazioni campionate.

Al fine di individuare i fattori di rischio di introduzione dei virus influenzali nelle popolazioni di volatili domestici in aree umide del territorio nazionale, con particolare riferimento a quelle delle regioni Veneto e Lombardia, che si sono dimostrate ad elevato rischio di infezione, e così identificare e prevedere adeguate misure di prevenzione, viene attivato un piano di monitoraggio nelle specie selvatiche durante le fasi di migrazione/svernamento (autunno/inverno).

Il piano di monitoraggio nazionale si basa sulle seguenti linee guida concordate in ambito comunitario:

A. sorveglianza attiva su animali vivi o cacciati

- identificazione delle specie di uccelli selvatici a rischio in base ai flussi migratori (origine e rotte), presenza in Europa e possibili contatti con la popolazione avicola domestica;
- identificazione dei siti a rischio basata su possibilità di contatti tra le varie popolazioni di volatili selvatici in particolari aree a rischio, vicinanza con aree densamente popolate di allevamenti (DPPA) e posizionamento sulle maggiori rotte migratorie;
- identificazione della tempistica dei controlli in base alla stagionalità delle migrazioni.

B. sorveglianza passiva su volatili selvatici ritrovati morti

La sorveglianza passiva dei volatili selvatici malati e morti deve concentrarsi:

- nelle zone dove si registra un'accresciuta incidenza della morbilità e della

mortalità tra i volatili selvatici;

- nelle zone in vicinanza del mare, dei laghi e dei corsi d'acqua dove vengono rinvenuti volatili morti, in particolare nel caso in cui queste zone si trovino in prossimità di allevamenti di pollame domestico;
- sugli uccelli appartenenti alle specie considerate «a più alto rischio» e su altri volatili selvatici che vivono a stretto contatto con essi.

4.1.5.1 Schema e attuazione della sorveglianza

A. Sorveglianza attiva

Le principali aree di presenza degli anatidi selvatici sul territorio nazionale sono rappresentate dalle zone umide delle regioni: Piemonte, Lombardia, Veneto, Friuli Venezia Giulia, Emilia Romagna, Toscana, Puglia. Per quanto riguarda la presenza di allevamenti del pollame domestico le maggiori concentrazioni sono nelle regioni Lombardia, Veneto ed Emilia Romagna. In queste aree i prelievi verranno effettuati nella Laguna di Venezia (Veneto), nella parte "emiliana" del Parco Nazionale del Delta del Po, e nel bacino imbrifero del medio corso del Po (Lombardia).

Verranno inoltre identificate aree umide, particolarmente a rischio, presenti nel territorio delle Regioni Veneto, Lombardia e Emilia Romagna dove è presente una popolazione di anatidi semi-stanziali che possono rappresentare un fattore di rischio per il contatto con uccelli selvatici.

L'intensità di campionamento prevista è pari a 2500 individui per il macro-areale "Fiume Po" di cui 1000 in Veneto, 300 in Emilia Romagna e 200 in Lombardia. Tale intensità di campionamento è adeguata per stimare la prevalenza del virus con un prevalenza attesa pari al 2% (I.C. 95%: 1%-3%). Per le altre aree si preleveranno 180 campioni che permettono di stimare la prevalenza del virus con una prevalenza attesa del 3% (I.C. 95% 1,5%-4,5%). I restanti campioni verranno effettuati nelle zone umide a maggior rischio che verranno identificate nelle zone colpite dalle pregresse epidemie. In totale si effettueranno circa 4500 campioni per una

suddivisione geografica come riportata precedentemente con la proporzione di cui sopra per quanto riguarda le specie.

Il piano raggiunge la numerosità campionaria stabilita anche avvalendosi di uccelli abbattuti durante l'attività venatoria in particolare per le regioni: Puglia, Calabria, Sicilia e Toscana. Per quanto riguarda le regioni dell'Alto Adriatico (Emilia Romagna, Veneto e Friuli Venezia Giulia) si cerca di ottenere l'intero campionamento previsto attraverso apposite catture in almeno 4 siti specificamente dedicati.

B. Sorveglianza passiva

Le linee guida comunitaria raccomandano che la sorveglianza passiva mantenga alti livelli di intensità. In particolare, sulla base dell'esperienza effettuata in Italia, è indispensabile escludere la presenza di H5N1 in ogni individuo trovato morto appartenente ai gruppi tassonomici:

- a) Podicipedidae (Svassi)
- b) Rapaci (diurni e notturni);
- c) Ardeidi (Aironi)
- d) Anatidae (Anatre, Oche e Cigni)
- e) Rallidae (Folga, Gallinella d'acqua, Pollo sultano ecc.)
- f) Recurvirostridae (Avocetta e Cavaliere d'Italia)
- g) Charadriidae (Pivieri e Pavoncella)
- h) Scolopacidae (Limicoli)
- i) Laridae (Gabbiani)
- j) Sterninae (Rondini di mare)

Anche per soggetti appartenenti ad altri gruppi tassonomici sarà comunque necessario escludere la presenza di H5N1 tramite la raccolta delle carcasse degli uccelli rinvenuti morti.

4.1.5.2 Raccolta ed analisi dei campioni

I prelievi, effettuati dall'ISPRA ex Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica con la collaborazione del Ce.R.M.A.S., sono eseguiti nel periodo primaverile, in considerazione del rischio collegato ai flussi migratori di ritorno dall'Africa, e nel periodo autunno/invernale, con particolare attenzione agli animali cacciati.

I prelievi nelle popolazioni stanziali (specie nidificanti) possono essere effettuati nel periodo tra febbraio e agosto.

A tal proposito si è rivelata indispensabile l'attivazione di una stretta collaborazione con le associazioni venatorie e con gli enti responsabili a livello territoriale.

Nell'ambito di tale campionamento devono essere prelevati tamponi cloacali per l'esecuzione dell'esame virologico prioritariamente distribuiti per un 80% fra gli anatidi, per un 10% fra i limicoli e per un restante 10% fra altri uccelli selvatici.

I campioni raccolti sono costituiti in prevalenza da tamponi cloacali e sangue.

I campioni cloacali e orofaringei da sottoporre a esame sierologico sono prelevati da volatili allo stato libero apparentemente sani. Se per qualche motivo non è possibile prelevare tamponi cloacali da volatili vivi, un'alternativa può essere data da campioni di feci fresche raccolte con cura. Deve tuttavia essere garantita la tracciabilità in caso di siti frequentati da varie specie di volatili.

I tamponi cloacali e tracheali/orofaringei, e/o i campioni di tessuto (in particolare di cervello, cuore, polmoni, trachea, reni e intestino) di volatili selvatici trovati morti o abbattuti devono essere prelevati per l'isolamento del virus e la diagnosi molecolare (PCR). Occorre prestare particolare attenzione nella conservazione e nel trasporto dei campioni. I tamponi devono essere subito refrigerati con ghiaccio o con panetti di gel ghiacciato e fatti pervenire al laboratorio con la massima tempestività. I campioni non devono essere congelati a meno che ciò non sia assolutamente necessario. Se possibile, i tamponi devono essere posti in un terreno di trasporto antibiotico o specifico per virus in modo da essere completamente immersi.

Collocare i tamponi in un terreno di trasporto è un'operazione necessaria aggiuntiva e non alternativa rispetto alla refrigerazione. In assenza di un terreno di trasporto, i tamponi devono essere nuovamente inseriti nei loro contenitori e spediti allo stato secco. Se non è sicuro che il trasporto al laboratorio possa avvenire rapidamente entro 48 ore (in un terreno di trasporto a 4 °C), i campioni devono essere immediatamente congelati, immagazzinati e successivamente trasportati in ghiaccio secco. Una serie di fattori può incidere sulla conservazione e sul trasporto dei campioni; di conseguenza il metodo prescelto deve essere adatto allo scopo.

La raccolta dei campioni deve avvenire secondo quanto contemplato dal manuale diagnostico per l'influenza aviaria (decisione 2006/437/CE) che stabilisce procedure per la conferma e la diagnosi differenziale dell'influenza aviaria.

Gli esami di laboratorio devono essere eseguiti secondo quanto contemplato dal manuale diagnostico per l'influenza aviaria (decisione 2006/437/CE) che stabilisce procedure per la conferma e la diagnosi differenziale dell'influenza aviaria. Tuttavia, qualora siano previsti esami non contemplati dal manuale diagnostico per l'influenza aviaria o non descritti nel manuale dell'OIE sugli animali terrestri, gli Stati membri, nel presentare alla Commissione il proprio programma per approvazione, devono contemporaneamente fornire al laboratorio comunitario di riferimento i dati necessari ai fini della convalida.

Non appena possibile, tutti i campioni raccolti nel quadro della sorveglianza dell'influenza aviaria nei volatili selvatici devono essere analizzati mediante metodiche molecolari, se disponibili, e conformemente al manuale diagnostico (decisione 2006/437/CE). Questi esami devono essere eseguiti solo in laboratori che siano in grado di garantire l'assicurazione qualità e che si avvalgano di metodi riconosciuti dal laboratorio comunitario di riferimento per l'influenza aviaria. Inoltre i metodi utilizzati devono aver dato risultati accettabili nell'ultimo ring test tra laboratori nazionali. Si raccomanda uno screening iniziale mediante PCR del gene M, con test rapido dei positivi all'H5 (da eseguire comunque entro due

settimane); nel caso di un accertamento positivo occorre effettuare quanto prima l'analisi del sito di clivaggio per determinare se possieda un motivo dell'influenza aviaria ad alta patogenicità (HPAI) o dell'influenza aviaria a bassa patogenicità (LPAI). Se viene confermata l'HPAI H5, devono essere rapidamente effettuate ulteriori analisi per determinare il tipo N (anche se ciò serve solo ad escludere in modo comprovato l'N1).

Nel laboratorio può essere consentito raggruppare al massimo cinque campioni della stessa specie raccolti nello stesso sito e nello stesso momento, purché si possa garantire la possibilità di individuare e sottoporre nuovamente a test i singoli campioni, nel caso di un accertamento positivo.

La sorveglianza sierologica non si applica alle indagini dell'influenza aviaria nei volatili selvatici, in quanto le metodiche sierologiche non sono in grado di distinguere tra ceppi ad alta patogenicità e ceppi a bassa patogenicità e i risultati relativi agli anticorpi non consentono alcuna deduzione circa il luogo in cui i volatili selvatici potrebbero probabilmente aver contratto l'infezione. La sorveglianza sierologica potrebbe tuttavia essere importante per studiare in quali specie di uccelli stanziali o migratori siano/fossero prevalenti (o endemici) i virus H5/H7. Tali analisi devono essere condotte solo da laboratori specializzati che si avvalgano di un gruppo di antigeni selezionato con cura in modo da garantire l'individuazione degli anticorpi specifici per l'emoagglutinina (per eliminare cioè l'interferenza da anticorpi anti-N specifici)

PARTE V
STUDIO SPERIMENTALE

PREMESSA

I due obiettivi prioritari della sorveglianza dell'influenza aviaria nelle popolazioni di uccelli selvatici sono:

- una regolare sorveglianza di base di diverse specie di uccelli selvatici nell'ambito del monitoraggio continuo della circolazione di virus LPAI, focalizzata sulle specie ad alto rischio;
- l'evidenziazione precoce del virus HPAI H5N1 attraverso l'indagine sui casi di morbilità e mortalità nei uccelli selvatici, con particolare attenzione alle specie ad alto rischio.

I metodi utilizzati si traducono in attività di sorveglianza attiva, su uccelli apparentemente sani catturati o abbattuti, e di sorveglianza passiva, attraverso l'esame di uccelli rinvenuti morti o malati.

La valutazione dell'efficacia di una forma di sorveglianza rispetto all'altra e, non meno importante, della reale fattibilità del piano di monitoraggio "migliore", permette di convogliare gli sforzi di campionamento nella direzione che presenta il miglior rapporto costi/benefici, ottimizzando le risorse umane e finanziarie disponibili.

Attraverso un'analisi dei risultati finora ottenuti dal monitoraggio dell'influenza aviaria in ambito nazionale ed europeo ed uno studio su basi statistiche, supportato dall'utilizzo di modelli matematici, dell'efficacia della sorveglianza (attiva e passiva) nell'avifauna selvatica, il presente studio intende definire le migliori strategie di sorveglianza per una rilevazione rapida della circolazione del virus dell'influenza nelle popolazioni di uccelli selvatici di passo e svernanti nel nostro Paese.

5.1 MATERIALI E METODI

5.1.1 Sorveglianza dell'influenza aviaria nelle popolazioni selvatiche. Analisi dei risultati

5.1.1.1 Sorveglianza in Europa. Anni 2004-2007

Tra il 2003 e il 2004 un numero relativamente basso di uccelli selvatici furono testati per AI in alcuni Stati dell'Unione: 3.828 uccelli nel 2003 da 11 Stati membri, risultando 9 positivi per AI (nessun H5, sei positivi per H7); 8943 testati nel 2004, risultando in 214 positivi, tra i quali 15 per H5 e sette per H7.

Nel 2005, sono stati testati 47.232 uccelli, quasi 6 volte il numero di campioni testati nel corso dell'anno precedente, con la partecipazione di tutti i 25 Stati membri. 165 campioni sono risultati positivi per i sottotipi H5/H7. Il sottotipo H5 è stato trovato in 10 Stati membri e cioè: Danimarca, Francia, Germania, Grecia, Italia, Lettonia, Paesi Bassi, Spagna, Svezia e Regno Unito (Cooke, Powell et al.).

Tra febbraio e dicembre 2006, sono stati esaminati i campioni provenienti da 120.706 uccelli, con una crescita di tre volte rispetto al 2005. Oltre metà degli uccelli (55%) sono stati campionati tra febbraio e marzo 2006.

Nel corso dell'anno il focus della sorveglianza è passato dalla sorveglianza passiva (testando uccelli morti o malati) alla sorveglianza attiva (testando uccelli vivi e cacciati). Questo passaggio è probabilmente giustificato da diversi fattori quali la focalizzazione della sorveglianza attiva alla migrazione autunnale, la diminuita mortalità di uccelli selvatici, e forse il calare dell'attenzione dell'opinione pubblica dopo il cessare delle epidemie da H5N1 HPAI. La percentuale di uccelli campionati con la sorveglianza attiva è variata nei Paesi membri tra lo 0% della Repubblica Ceca al 95% del Belgio.

I campioni sono stati raccolti da almeno 330 specie di 22 ordini. L'ordine più frequentemente campionato è stato degli *Anseriformes* (53%) seguito dai

Charadriiformes (10%). Del totale, il 51% erano specie ad alto rischio (HRS) con percentuali nazionali oscillanti tra il 4% (Bulgaria) e il 70% (UK). Le specie con la più alta percentuale delle popolazioni biogeografiche campionate attivamente o passivamente sono state il cigno reale (*Cygnus olor*) ed il cigno comune (*Cygnus cygnus*) con oltre il 6% della popolazione di cigno reale britannica ed il 2,3% delle popolazioni di Europa nord-occidentale e centrale campionate. Nessun'altra specie è stata campionata ad un tasso superiore all'1% della popolazione stimata. La specie campionata in maggior numero è stata il Germano (*Anas platyrhynchos*), con oltre lo 0,5% (24.297) della popolazione del Nord-Ovest Europa testata.

L'infezione da virus HPAI è stata rilevata in 748 campioni (prevalenza 0,6%), le positività concentrate tra metà febbraio e la fine di aprile e collegate nella quasi totalità al rinvenimento di uccelli morti o con sintomi clinici di malattia. La maggior parte delle positività (62,7%) sono state evidenziate in specie di cigni, seguite da anatre (16,2%), oche (4,4%), rapaci (3,9%) e altri volatili selvatici (12,8%).

Le infezioni da sottotipi diversi da H5N1 HPAI sono state rilevate in 1.613 uccelli appartenenti ad almeno 61 specie (nessuna informazione su specie nel 6,1% dei casi) di dieci ordini in 18 Stati membri. LPAI sottotipo H5 è stato evidenziato in 136 campioni (8,4% dei positivi) e LPAI H7 in 26 campioni (1,6% di positivi).

In contrasto con i risultati ottenuti per H5N1 HPAI, la prevalenza per LPAI è risultata più alta nella sorveglianza attiva (uccelli vivi o cacciati) piuttosto che in quella passiva (animali morti o ammalati). Di tutti i campioni positivi per LPAI, l'82% erano uccelli catturati vivi o cacciati.

Comparabilmente con la prevalenza campionaria rilevata per H5N1 HPAI, la percentuale più alta di uccelli positivi per LPAI sono *Anseriformes* (2,2%, 1.427/64.487), seguiti dai *Podicipediformes* (0,97%, 3/310). La maggior parte delle infezioni da LPAI sono state rilevate con una sorveglianza attiva.

I Germani (*Anas platyrhynchos*), che rappresentano un terzo del totale degli uccelli campionati, sono risultati positivi solo per un 5,6% di tutti i casi di H5N1 HPAI, mentre contano il 61% delle positività per virus influenzali diversi da H5N1 HPAI.

In tutto, solo lo 0.26% dei Germani campionati tra febbraio e marzo e lo 0.3% dei Germani campionati attraverso la sorveglianza passiva sono risultati positivi a H5N1 HPAI. Tutti i 34 germani infettati con H5N1 HPAI sono stati rinvenuti morti. Per quanto riguarda le altre specie, con l'eccezione di 39 cigni reali (*Cygnus olor*) in Polonia e di un gabbiano reale (*Larus argentatus*) in Danimarca, tutti gli uccelli positivi per H5N1 HPAI erano stati trovati morti o malati. Al contrario, solo il 17% (271/1613) degli uccelli risultati positivi per virus dell'influenza A diversi da H5N1 HPAI furono trovati morti o dimostravano segni di malattia.

Nelle figure 12 e 13 sono riportati sotto forma di grafici a barre i risultati delle attività di sorveglianza in termini di casi di positività per HPAI suddivisi per settimana di campionamento e per specie.

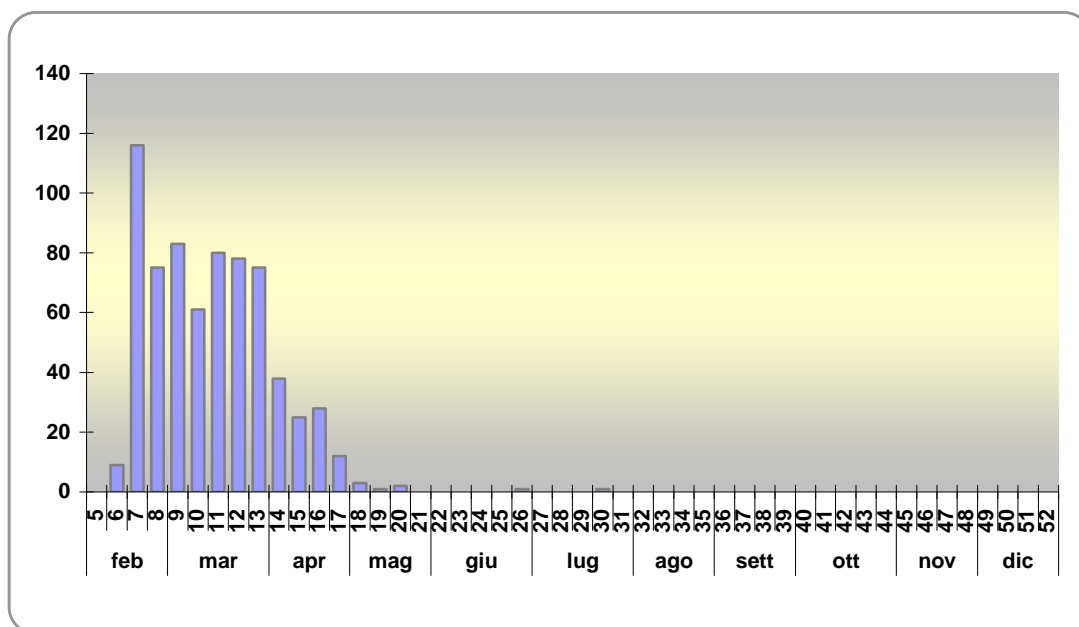


Fig. 12 - Numero di casi di positività in volatili selvatici per HPAI (totale 748 casi) segnalati dagli Stati membri all'ADSN suddivisi per settimana/mese di campionamento nel 2006 (febbraio-dicembre).

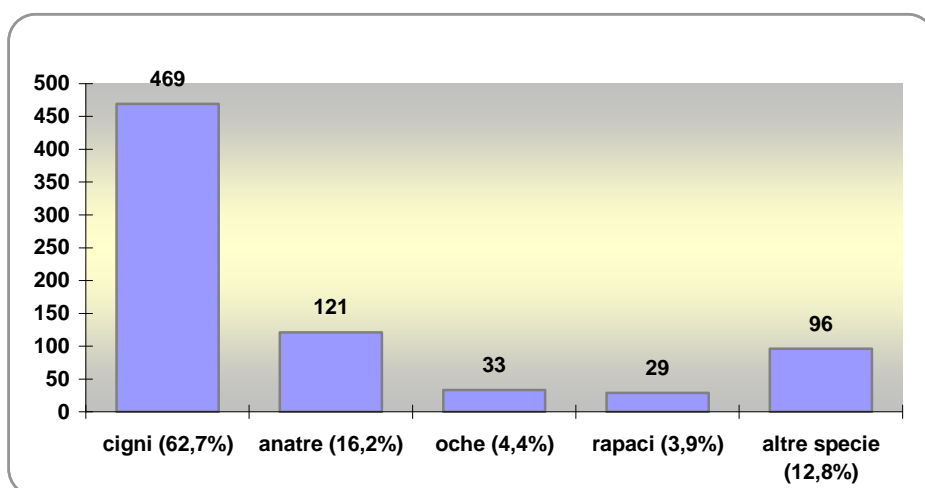


Fig. 13 - Numero di casi di positività in volatili selvatici per HPAI (totale 748 casi) segnalati dagli Stati membri all'ADSN suddivisi per specie nel 2006 (febbraio-dicembre).

Nel 2007, nei 27 Stati membri dell'Unione europea sono stati testati un totale di 79.392 uccelli selvatici. A differenza di quanto avvenuto nel 2006, quando i casi di influenza aviaria da virus H5N1 in uccelli selvatici sono stati segnalati in 14 Paesi, nel 2007 gli incidenti da HPAIV sono stati segnalati solo in 4 Stati membri, con una precisa localizzazione spaziale e temporale. Un totale di 307 casi di H5N1 HPAIV sono stati riportati da nove episodi in quattro in Repubblica Ceca (1), Germania (298), Francia (7) e Polonia (1). Con l'eccezione di tre casi in uccelli selvatici in cattività riferito dalla Polonia verificatesi nel mese di dicembre, tutti gli incidenti si sono verificati durante i mesi estivi tra giugno e agosto, al di fuori del principale periodo di migrazione.

La maggior parte dei casi sono stati rilevati attraverso il ritrovamento di cigni morti. Con l'eccezione di uno cigno apparentemente sano, campionato comunque nella zona di un focolaio, tutti i volatili infetti sono stati trovati morti (305) o mostravano segni clinici al momento del campionamento (2). In Germania si è osservata elevata mortalità in svassi piccoli (*Podiceps nigricollis*) e svassi maggiori (*Podiceps cristatus*). In totale almeno 14 specie sono risultate positive al

virus HPAI H5N1. Con l'eccezione di un tuffetto (*Tachybaptus ruficollis*) e una cicogna bianca (*Ciconia ciconia*) tutte le specie positive per H5N1 HPAIV nel 2007 hanno presentato positività anche nel 2006. I risultati della sorveglianza nel 2007 suggeriscono che la presenza del virus H5N1 HPAIV fosse il risultato di una nuova introduzione piuttosto che di una circolazione del virus a bassi livelli.

In primo luogo, il numero settimanale di casi di uccelli selvatici nel 2006 così come nel 2007, descrive delle curve epidemiche separate tipiche di una malattia infettiva. In secondo luogo, l'analisi filogenetica ha dimostrato che il virus trovato nel 2007 è chiaramente differenziato da quelli associati a precedenti focolai nel pollame e nei volatili selvatici nell'Unione europea.

Nelle figure 14 e 15 sono presentati i casi da HPAI segnalati in Europa nel 2007 suddivisi per settimana/mese di campionamento e specie coinvolte.

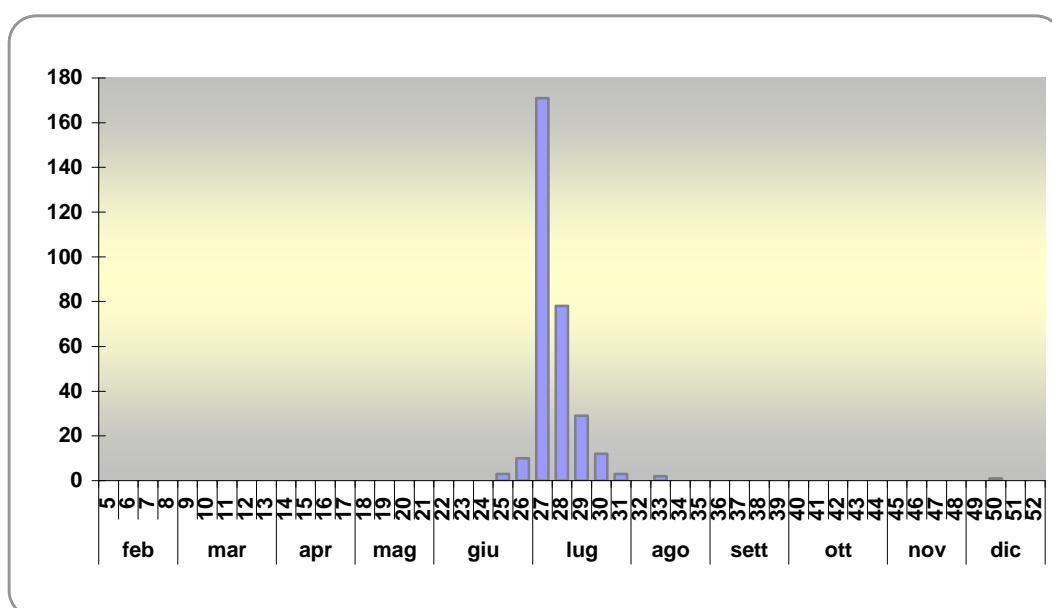


Fig. 14 - Numero di casi di positività in volatili selvatici per HPAI (totale 307 casi) segnalati dagli Stati membri all'ADSN suddivisi per settimana di campionamento nel 2007 (febbraio-dicembre).

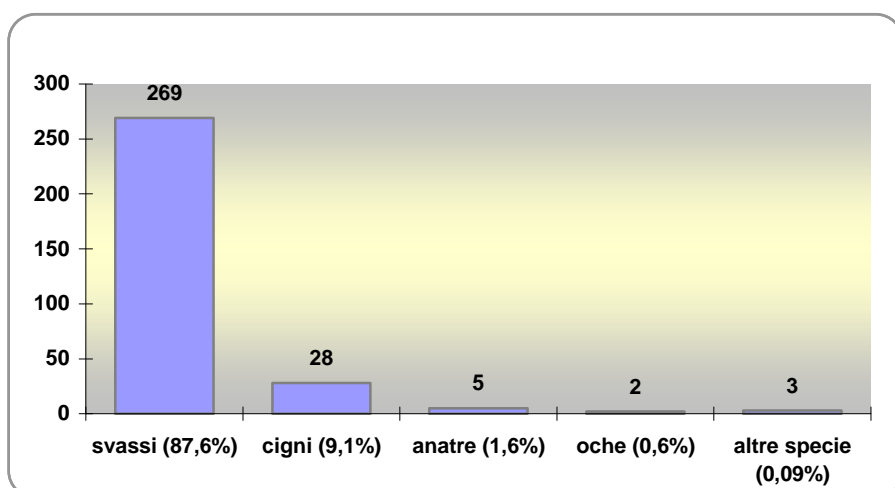


Fig. 15 - Numero di casi di positività in volatili selvatici per HPAI (totale 307 casi) segnalati nel 2007 dagli Stati membri all'ADSN suddivisi per specie (febbraio-dicembre).

Analizzando i dati di campionamento riferiti ai diversi Stati membri per l'anno 2007 si nota una ampia variabilità nel numero totale di campioni raccolti per anno ed una eterogeneità nella proporzione tra attività di sorveglianza attiva e passiva. In 24 Stati (88% del totale) il tipo di sorveglianza che ha conferito il maggior numero di campioni risulta la sorveglianza attiva, con percentuali variabili dal 53,1% della Grecia al 97,5% del Belgio. Un solo Paese, la Repubblica Ceca, ha attuato una sorveglianza basata unicamente sulla raccolta di soggetti morti o malati. Sul numero di campioni raccolti nei Paesi europei, una percentuale variabile tra il 4,4% (Cipro) e il 93,6% (Latvia) derivano da specie definite ad alto rischio (HRS), con una media europea pari al 57,2%. Per un dettaglio sui piani di campionamento attuati nei singoli Stati membri si rimanda alla tabella riportata in Appendice II.

Il dato europeo riferito al 2007 restituisce, sul totale dei 79.392 campioni esaminati, una percentuale di campioni raccolti con la sorveglianza attiva (soggetti abbattuti e catturati) pari al 77,5% (n = 61.529) ed è pari al 21,7% (n = 17.228) la quota di campioni riconducibili ad attività di sorveglianza passiva; ammontano a 635 (0,8%) i campioni per i quali non si conosce la modalità di raccolta. I dati esposti sono

riassunti nel grafico di figura 16.

Il grafico riportato in figura 17 descrive le attività di sorveglianza attuate in Europa tra il 2006 e il 2007 (periodo febbraio-dicembre) in base al mese di campionamento, riportando il tipo di sorveglianza (attiva, passiva, sconosciuta) e la sorveglianza attuata su HRS in rapporto ai focolai segnalati nel pollame domestico e nei volatili selvatici.

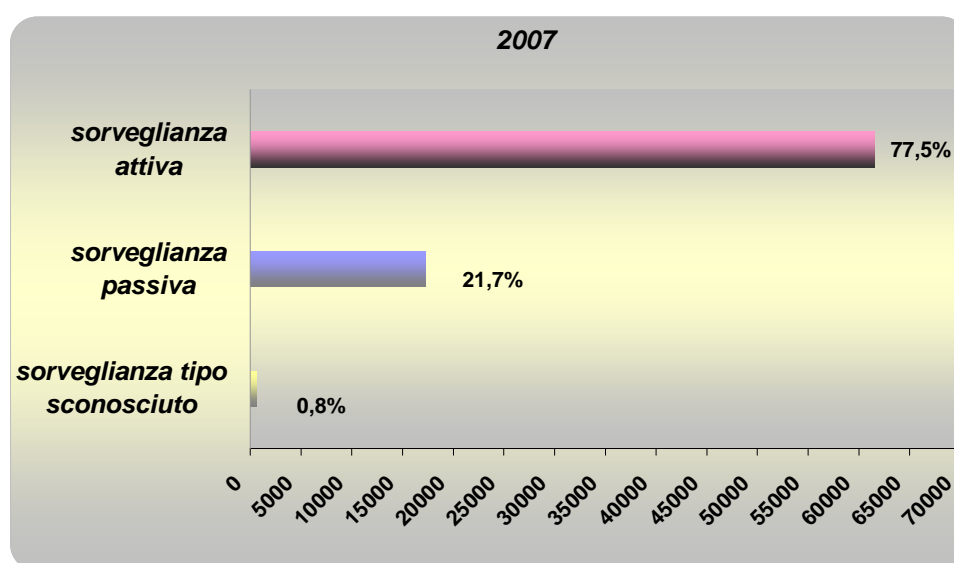


Fig. 16 - Numero e percentuale di soggetti campionati in attività di sorveglianza attiva e passiva in Europa nel corso del 2007. (Fonte: <http://www.eurosurveillance.org>)

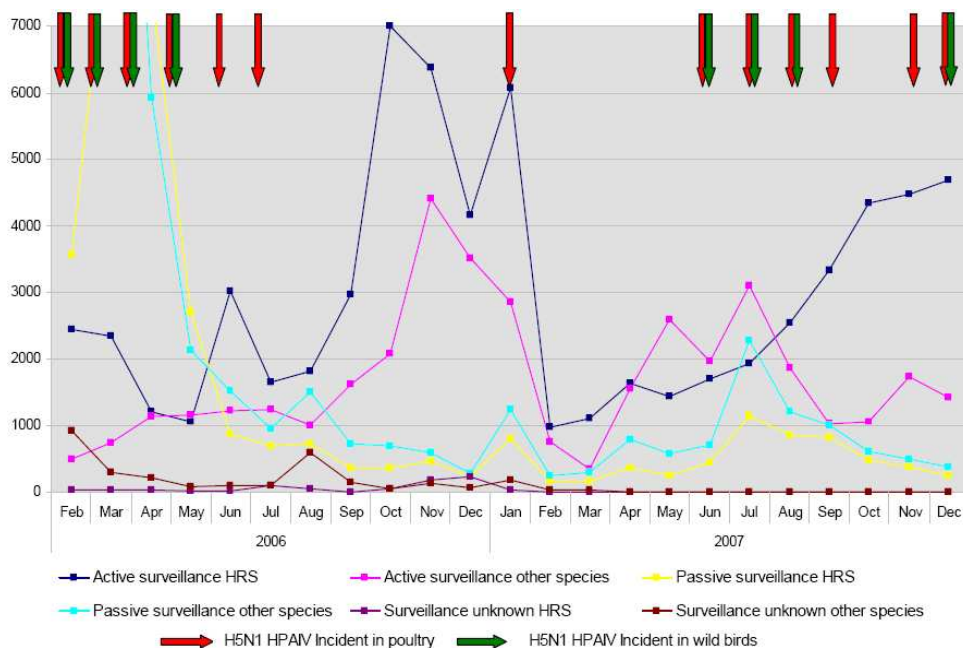


Fig. 17 - Numero totale di uccelli campionati in base a tipo di sorveglianza e mese nel 2006/07 (Fonte: <http://www.eurosurveillance.org>)

5.1.1.2 Sorveglianza in Italia. Anni 2006-2008

I campioni esaminati sono stati in prevalenza tamponi cloacali e tamponi oro-faringei/tracheali, in minor misura feci, organi e sangue. In molti casi, al fine di aumentare la sensibilità del campionamento, sono stati effettuati sullo stesso soggetto sia tamponi tracheali che cloacali. I campioni sono stati raccolti da differenti specie appartenenti soprattutto all'ordine degli Anseriformi e dei Caradriiformi catturati o abbattuti durante la normale attività venatoria.

Il Centro di Referenza Nazionale OIE/FAO per l'influenza aviaria, con sede presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, mette a disposizione sul proprio sito (<http://www.izsvenezie.it>) i risultati dell'attività di monitoraggio.

Tra ottobre 2005 e ottobre 2006 sono stati analizzati per la ricerca di virus HPAI

H5N1 13.377 campioni, dei quali circa il 33% è rappresentato da anatidi (catturati, abbattuti e rinvenuti morti), il restante da volatili selvatici di diverse specie abbattuti o rinvenuti morti. Nessun campione è risultato positivo per virus HPAI H5N1. L'anno successivo (stagione 2006-2007) i campioni esaminati sono stati 8118, dei quali più della metà provengono da anatidi selvatici. Il grafico e la tabella in figura 18 rappresentano i dati appena esposti mettendo a confronto il campionamento nelle due stagioni.

Si osserva chiaramente come tra un anno e l'altro ci siano notevoli differenze sia nel numero totale di campioni esaminati sia nella composizione del campione, in particolare nel 2006/2007 sono diminuiti significativamente i campioni prelevati da volatili diversi dagli anatidi (principalmente limicoli, rallidi, laridi, ardeidi) rinvenuti morti o abbattuti.

Non è stata rilevata la circolazione di virus ad alta patogenicità (HPAI) nei campioni esaminati.

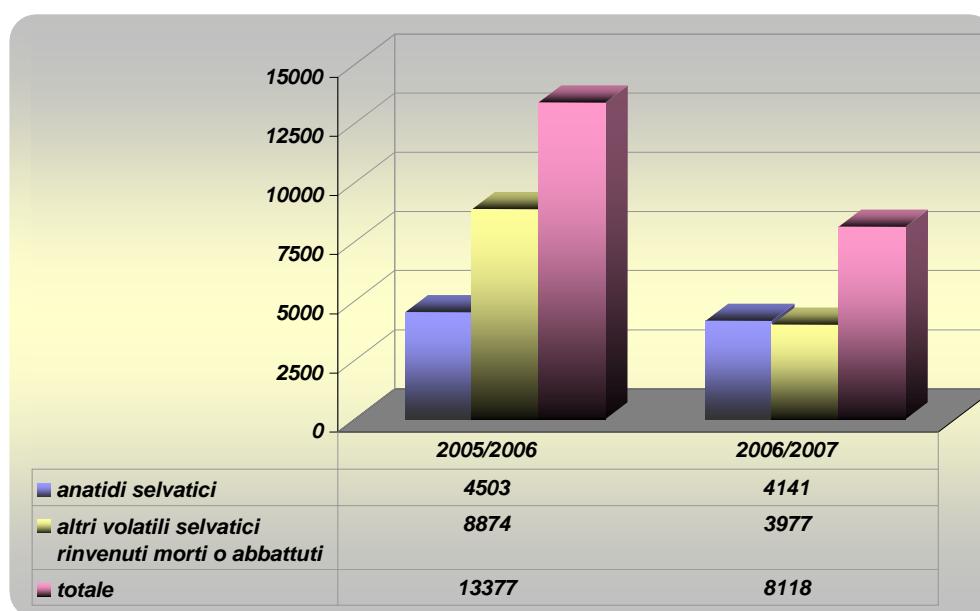


Fig. 18 – Campioni raccolti nelle stagioni 2005/06 e 2006/07 provenienti da anatidi e da volatili di altre specie

Nel corso del 2007 sono stati esaminati 7.652 soggetti, dei quali 162 sono risultati positivi in Real time RT-PCR o RT-PCR (2,1%) per virus influenzali di tipo A. Nel complesso, sono stati isolati, da volatili acquatici migratori e stanziali appartenenti all'Ordine degli Anseriformi 47 virus influenzali a bassa patogenicità appartenenti a 17 differenti sottotipi (vedi tabella 6)

Non è stata rilevata la circolazione di virus ad alta patogenicità (HPAI) nelle aree campionate.

Il periodo con la maggiore intensità di campionamento risulta il trimestre gennaio-marzo, e nel periodo autunno-invernale (ottobre-marzo) si concentrano oltre il 65% dei campioni totali (come riportato in figura 20).

Tab. 6 – Specie positive all'isolamento virale e sottotipi virali isolati nel 2007

<i>Specie</i>	<i>Soggetti positivi</i>
CIGNO REALE (<i>Cignus olor</i>)	1 (H3N8)
FISCHIONE (<i>Anas penelope</i>)	2 (H6N5)
GERMANO REALE (<i>Anas platyrhynchos</i>)	35 (H3N8, H5N2 LPAI, H1N1, H7N3 LPAI, H10N1, H11N9, H10N7, H5N3 LPAI, H9N2, H2N3, H2N5, H2N6, H3N1, H4N6, H5N8 LPAI, H7N1 LPAI)
MARZAIOLA (<i>Anas querquedula</i>)	1 (H4N6)
GABBIANO COMUNE (<i>Larus ridibundus</i>)	1 (H13N8)
CIGNO NERO (<i>Cignus atratus</i>)	2 (H5N2 LPAI)
ALZAVOLA (<i>Anas crecca</i>)	3 (H1N1, H2N3)
MESTOLONE (<i>Anas clypeata</i>)	3 (H7N3 LPAI, H4N6)
Totale	48

Nel corso del 2008 sono stati raccolti campioni da 4.383 soggetti di 119 specie appartenenti a 14 Ordini (*Accipitriformes*, *Anseriformes*, *Charadriiformes*, *Passeriformes*, *Ciconiiformes*, *Columbiformes*, *Falconiformes*, *Pelecaniformes*, *Phoenicopteriformes*, *Procellariiformes*, *Galliformes*, *Gruiformes*, *Strigiformes*, *Coraciiformes*). Di questi, 126 sono risultati positivi per virus influenzali di tipo A (1,9%)

Tra i campioni positivi per virus influenzali 2 sono risultati positivi per il sottotipo H5 (1,6%) e 4 per il sottotipo H7 (3,2%). I sottotipi virali predominanti sono risultati essere H1, H4, H6 e H7, rappresentando il 68% di tutti gli isolati. Le positività sono state riscontrate nelle province di Ferrara, Gorizia, Padova, Rovigo, Brescia, Cuneo, Pavia, Venezia.

Come già emerso negli anni precedenti il Germano (25 virus isolati), l'Alzavola (4 virus isolati), il Fischione (2 virus isolati) e il Mestolone (2 virus isolati) sono le specie che continuano a confermarsi i principali serbatoi per questa malattia, in particolare il germano (74% degli isolati), come riportato nella tabella 7.

Non è stato isolato nessun virus ad alta patogenicità.

Tab. 7 – Specie positive all'isolamento virale e sottotipi virali isolati nel 2008

<i>Specie</i>	<i>Soggetti positivi</i>
FISCHIONE (<i>Anas penelope</i>)	2 (H6N8)
GERMANO REALE (<i>Anas platyrhynchos</i>)	25 (H1N1, H1N2, H7N3 LPAI, H10N4, H9N2, H2N3, H2N3, H4N8, H4N6, H7N1 LPAI)
ALZAVOLA (<i>Anas crecca</i>)	4 (H1N1, H7N1 LPAI, H4N8, H12N5, H6N2)
MESTOLONE (<i>Anas clypeata</i>)	2 (H1N3, H10N7)
ANATRA (<i>Anas sp.</i>)	1 (H3N6)
Totale	34

Il maggior numero di campioni è stato raccolto da animali abbattuti durante la stagione venatoria e da animali catturati vivi senza sintomi clinici riferibili a influenza aviaria durante le operazioni di inanellamento, così che i campioni raccolti con attività di sorveglianza attiva rappresentano più del 90% dei totali (vedi figura 19).

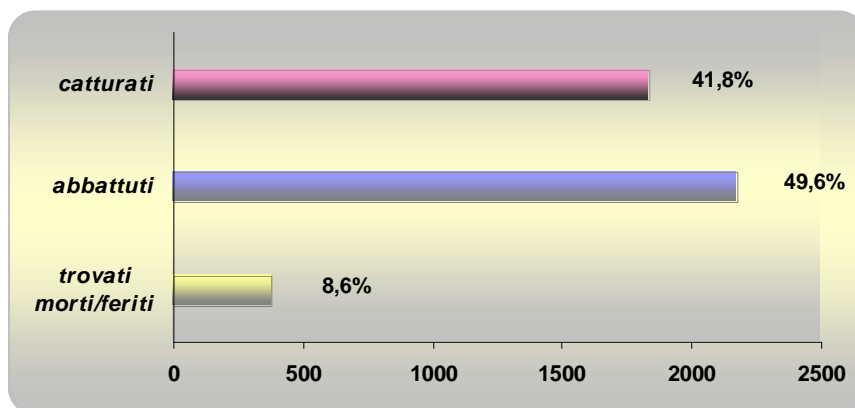
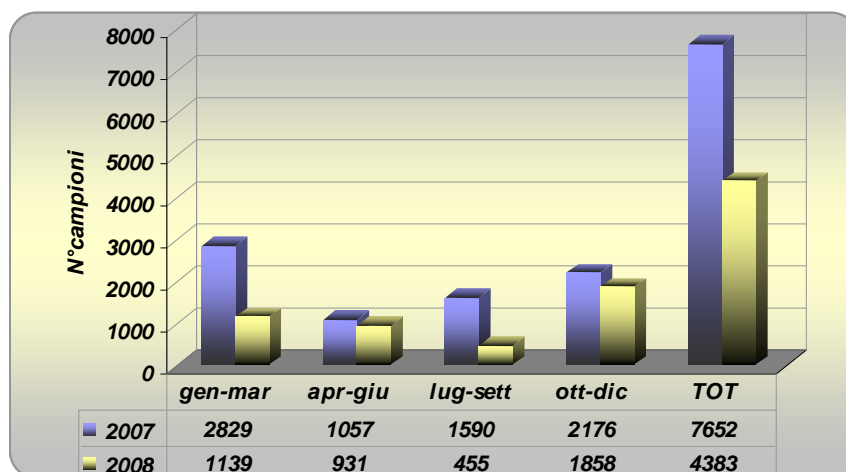
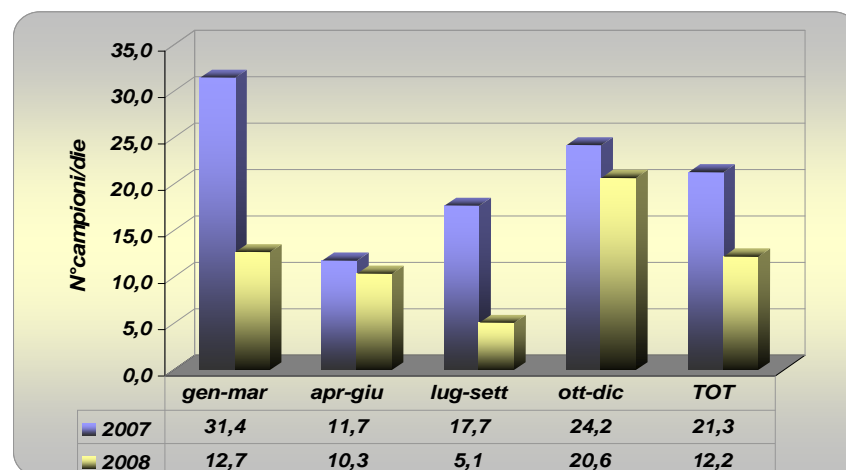


Fig. 19 - Composizione del campione esaminato nel 2008

Come già osservato per il 2007, gran parte dei campioni (più del 68%) derivano dalle attività di sorveglianza svolte nel periodo autunno-invernale. Mettendo a confronto il 2007 con il 2008, si nota come nel 2008 la dimensione totale del campione si sia quasi dimezzata rispetto all'anno precedente, con le più grosse differenze nei periodi gennaio-marzo e luglio-settembre. In figura è riportato il risultato del campionamento sia come numero di campioni totale per trimestre sia come numero di campioni raccolti ogni giorno, sempre suddiviso per periodi trimestrali.



a

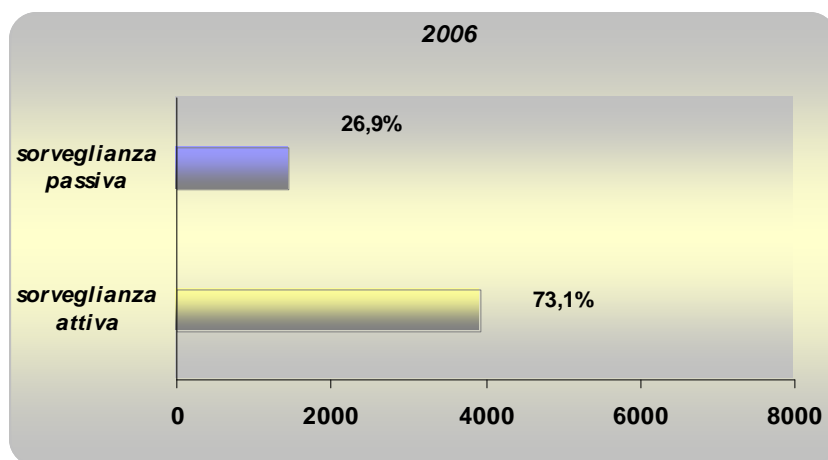


b

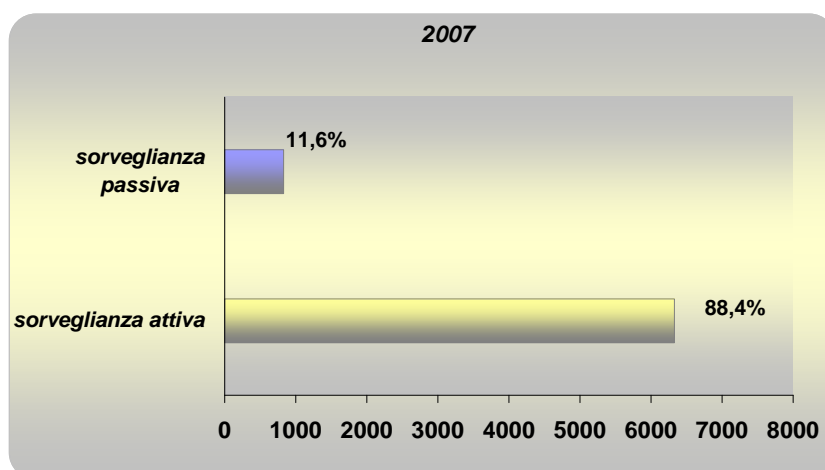
Fig. 20 - Campioni totali (a) e campioni/die (b) suddivisi in base al periodo di raccolta. Anni 2007 e 2008 a confronto.

Confrontando la proporzione di sorveglianza passiva ed attiva nei tre anni considerati si assiste ad una costante predominanza dei campioni raccolti attraverso attività di sorveglianza attiva, ed una variabilità moderata tra un anno e l'altro, più spiccata tra il 2006, quando la quota di campioni provenienti da animali malati e morti ha raggiunto il 26,9%, e gli anni successivi. Dal 2006 al 2008 la proporzione di campioni raccolti attraverso la sorveglianza attiva è andata progressivamente

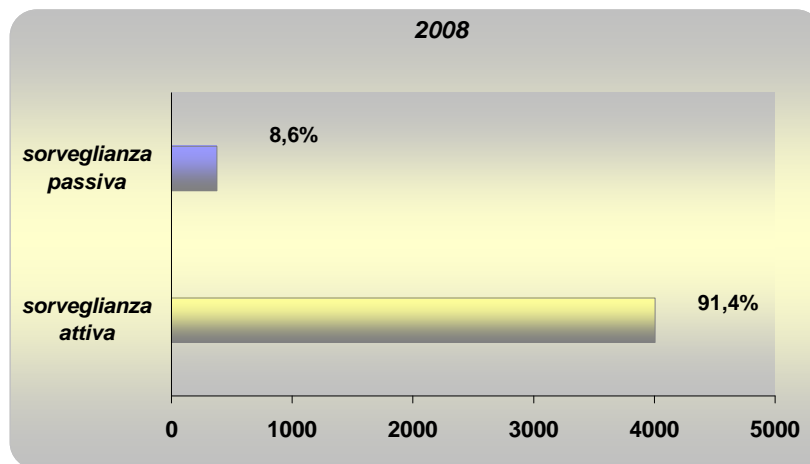
aumentando (dal 73,1% del 2006 al 91,4% del 2008) (Figure 21a, 21b e 21c).



a



b



c

Fig. 21 - Numero di campioni e relativa percentuale raccolti con sorveglianza passiva e attiva nel 2006 (a), 2007 (b) e 2008 (c).

5.1.2 Studio sui tassi di rilevamento dell'infezione

Viene descritta la metodica impiegata per confrontare su basi di calcolo deterministiche l'efficacia delle diverse forme di sorveglianza e campionamento utilizzate. Tale analisi preliminare viene condotta per effettuare una prima verifica su basi statistiche dell'efficienza dello sforzo campionario profuso nel corso delle attività di monitoraggio in Italia ed in Europa, oltre che per ottenere indicazioni utili all'allestimento del modello matematico, fase successiva dell'elaborazione. Per procedere ai calcoli, è necessario definire a priori la prevalenza attesa dell'infezione nelle popolazioni di volatili selvatici, e i tassi giornalieri di campionamento mediante cattura o abbattimento di animali apparentemente sani e di mortalità. Utilizzando dei tassi giornalieri di abbattimento, cattura e mortalità e riferendoli alla prevalenza virale attesa si ottengono dei tassi giornalieri di evidenziazione di almeno un individuo positivo, che possono essere confrontati tra loro per una valutazione oggettiva e matematicamente valida della metodica di campionamento

più efficace in diversi quadri epidemiologici.

Sono stati analizzate due condizioni: l'infezione da virus LPAI, caratterizzata da un andamento endemico nelle popolazioni selvatiche, da una prevalenza pari al 5% (dato riferito alla prevalenza da sottotipo H5 in Germani reali, De Marco *et al.*, 2004) e da assenza di sintomi clinici; l'infezione da virus HPAI H5N1, la cui epidemiologia nei volatili selvatici è in gran parte tuttora sconosciuta, in base ai dati disponibili può ragionevolmente essere caratterizzata da una prevalenza virale pari al 2%, da un andamento epidemico e da un tasso di letalità pari al 50% entro 4 giorni post-infezione (p.i.). Le informazioni sulla virulenza da virus H5N1 in specie selvatiche derivano da studi sperimentali nei quali Germani infettati con il virus isolato nel 2002 hanno mostrato alta morbilità e mortalità, presentando sintomi di malattia entro 3 giorni p.i., e una letalità pari al 50% entro 4 giorni p.i. (Sturm-Ramirez *et al.*, 2004). Mancano invece dati validi riguardo la mortalità in condizioni di campo. La decisione di definire per il presente studio un tasso di letalità pari al 50% in 4 giorni, quindi, risulta un'approssimazione in considerazione del fatto che i virus H5N1 isolati dagli ultimi episodi epidemici sono il risultato di una mescolanza eterogenea e complessa di diversi patotipi (Chen *et al.*, 2006), e che in natura la parziale copertura immunitaria fornita dalla presenza di anticorpi per i virus LPAI H5 può dar luogo a infezioni subcliniche o a tassi di letalità ridotti molto più spesso di quanto non si sia osservato nelle infezioni sperimentali.

I dati utili a definire il tasso giornaliero di abbattimento e di cattura degli anatidi selvatici sono ricavati da fonti bibliografiche e dall'analisi dei dati di sorveglianza per gli anni 2005-2008 (dati Piano Nazionale di Monitoraggio IZSVenezie), come dalla letteratura è ricavato il parametro demografico relativo alla mortalità naturale (Cramp e Simmons, 1977; Hammack *et al.*, 1976; Kalchreuer, 1996; Mihelson *et al.*, 1982). I tassi utilizzati nell'analisi sono riportati in tabella 8.

Il periodo considerato a rischio per l'introduzione dell'influenza aviaria in Italia ed in generale nel bacino del Mediterraneo è compreso tra giugno e febbraio, quindi i calcoli sono stati effettuati per un arco temporale pari a 270 giorni.

Tab. 8 - Valori utilizzati nel calcolo dei tassi giornalieri di rilevamento dell'infezione

<i>Denominazione</i>	<i>Valore</i>	<i>Tasso giornaliero</i>
Tasso di prelievo venatorio	40% in 270 gg	0,0015
Efficacia di cattura	25% in 270 gg	0,0009
Mortalità naturale	30% in 270 gg	0,0011
Tasso di letalità	50% in 4 gg	0,125

Moltiplicando il tasso giornaliero di campionamento per la prevalenza attesa per l'infezione si ottiene un tasso giornaliero di rilevazione di positività tra i soggetti campionati. Ad esempio, il tasso giornaliero di identificazione del virus LPAI tra gli uccelli abbattuti nel corso dell'attività venatoria risulta uguale al tasso giornaliero di abbattimento (0,0015) moltiplicato per la prevalenza attesa per LPAI (0,05), quindi $0,0015 * 0,05 = 0,000075$, definito come tasso di infezione negli uccelli abbattuti. Con questa metodologia di calcolo abbiamo ricavato i tassi di infezione per le diverse metodologie campionarie considerate, nel caso dell'infezione da virus a bassa e alta patogenicità. I tassi ottenuti sono stati confrontati ricavando gli *ODDS ratio* per ciascuna forma di campionamento, ed ottenendo le probabilità relative di successo delle diverse metodiche campionarie.

L'*ODDS ratio* è un metodo statistico che permette di calcolare il rapporto tra le frequenze osservate; un valore pari a 1 indica l'assenza di associazione tra le due quantità messe a confronto, un valore superiore a 1 indica un'associazione positiva (la grandezza al numeratore ha una probabilità maggiore di verificarsi di quella al denominatore), il caso è opposto per un valore inferiore a 1.

Il passo successivo è stato quello di riportare i tassi ottenuti alla numerosità della popolazione oggetto della sorveglianza, fissata a 10.000 individui, per chiarire meglio il significato dei risultati ottenuti.

5.1.3 Modello matematico

Sono stati allestiti modelli matematici per simulare la dinamica dell'infezione da virus dell'influenza aviaria a bassa e ad alta patogenicità H5N1 nelle popolazioni di volatili selvatici con lo scopo di verificare e sviluppare i risultati ottenuti con nella prima fase dello studio. In particolare, risultava di particolare utilità applicare le metodiche di campionamento già considerate nel capitolo precedente all'andamento dell'infezione nell'arco di tempo considerato nelle popolazioni ospiti, valutando non solo in termini qualitativi ma anche in termini numerici la convenienza e l'efficacia delle varie forme di sorveglianza. Infatti il ricorso alla modellizzazione permette di analizzare i risultati puntuali ottenuti da semplici calcoli matematici su una scala temporale che vede il modificarsi della consistenza dei diversi comparti di recettivi, infetti e immuni.

Prima di descrivere in dettaglio i criteri impiegati per costruire il modello matematico, è necessario fare cenno ad alcuni concetti fondamentali della modellistica e della dinamica di infezione.

5.1.3.1 I modelli matematici applicati all'epidemiologia delle malattie della fauna selvatica

Uno specialista della fauna selvatica che desidera ottenere un campione significativo di animali da una popolazione per attuare una sorveglianza dovrebbe iniziare dal sintetizzare le conoscenze sulla biologia della popolazione oggetto della sorveglianza e sull'epidemiologia della malattia. In pratica, uno studio pilota è raramente possibile, ma i ricercatori possono avvalersi dell'uso di simulazioni per rappresentare le caratteristiche di una popolazione e ricavare le proprietà delle stime ottenute in vari programmi di sorveglianza. Il primo passo, quindi, consiste nell'elaborazione di un modello di dinamica di popolazione e nell'assegnazione dello stato di malato/sano a ciascun individuo.

Un modello matematico può servire in alcuni casi a interpretare in modo qualitativo il fenomeno che si osserva, in altri quando la struttura del sistema biologico è ben delineata ed i dati sufficientemente precisi ha lo scopo di prevedere l'andamento quantitativo del fenomeno ed infine vi sono modelli predittivi, che cercano di risolvere i problemi che possono intervenire.

I modelli matematici di tipo descrittivo cercano di sintetizzare le informazioni disponibili su un determinato processo, senza cercare di spiegare il meccanismo su cui il processo è basato. Un modello interpretativo formula alcune ipotesi circa il processo che si sta studiando e fornisce le conseguenze logiche. Infine i modelli di tipo predittivo tentano di conoscere la risposta del sistema i cui effetti non possono essere osservati direttamente.

Riportiamo il punto di vista di G.F. Gause, biologo da sempre interessato ai modelli matematici:

“Non c'è dubbio che un problema biologico deve essere risolto per mezzo di sperimentazione e non al tavolo di un matematico. Tuttavia per penetrare più a fondo la natura di questi fenomeni, è indispensabile combinare il metodo sperimentale con la teoria matematica, una possibilità che si è potuta creare attraverso gli studi di brillanti ricercatori. La combinazione del metodo sperimentale con le teorie di tipo qualitativo e descrittivo è uno dei più potenti strumenti a disposizione della scienza contemporanea”.

La matematica ha quindi grandi ed interessanti potenzialità di applicazione, ma spesso il problema in esame può essere estremamente complesso ed è quindi necessario semplificarlo notevolmente per ottenere modelli su cui sia possibile applicare con successo gli strumenti matematici. In questo processo di semplificazione è necessario individuare, fra gli aspetti del problema quelli essenziali che caratterizzano il fenomeno, senza i quali il modello potrebbe risultare non aderente alla realtà.

Basandosi sulla situazione epidemiologica di una popolazione è possibile, avvalendosi dell'utilizzo di modelli matematici, tentare di descrivere le modalità secondo le quali una infezione si diffonde all'interno di una comunità di ospiti e comprendere gli effetti dell'impatto dell'infezione sulla popolazione in termini di sopravvivenza, riproduzione e struttura della popolazione (Wobeser, 1994).

I modelli matematici sono suddivisi in deterministici, dove non interviene il caso, e stocastici, nei quali si tiene conto del fatto che alcuni meccanismi di evoluzione possono essere influenzati da variazioni casuali ed in questi ultimi intervengono in modo consistente gli strumenti e gli argomenti della Teoria della Probabilità.

Modelli matematici di tipo deterministico non permettono di predire con esattezza l'andamento futuro di un'infezione (Anderson e May, 1992), perché anche i modelli più complessi sono il risultato di una semplificazione eccessiva (Heesterbeek e Roberts, 1995); consentono però di venire a conoscenza di fattori che influenzano una malattia, di relazioni esistenti tra i meccanismi che agiscono a livello individuale, di ripercussioni a livello di popolazione (Anderson e May, 1992), di chiarire quali siano i parametri critici che influenzano l'andamento dell'infezione e di sperimentare eventuali misure di controllo (Heesterbeek e Roberts, 1995).

5.1.3.2 Dinamica di infezione

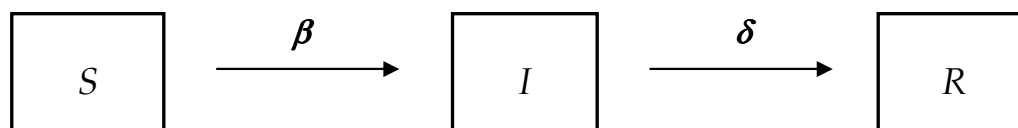
L'infezione da parte di parassiti è ubiquitaria tra gli animali selvatici (Wobeser, 1994) e studi teorici suggeriscono un ruolo del parassitismo nella regolazione della consistenza e nel mantenimento della diversità genetica della popolazione ospite (Anderson e May, 1978; Hamilton, 1982; O'Brien e Evermann, 1988), pur restando scarse le conoscenze attuali sull'impatto delle malattie infettive sulle popolazioni selvatiche (Gulland, 1995).

Il successo di una infezione non dipende unicamente dalla sopravvivenza dell'agente causale ma dall'interazione di fattori quali la sopravvivenza dello stesso, la capacità di riprodursi e di trasmettersi, pur determinando effetti dannosi sui

propri ospiti (Hudson, 2002). L'impatto di un'infezione sulla popolazione dipende sia da caratteristiche intrinseche al parassita (infettività, contagiosità, virulenza, resistenza ambientale) sia da quelle della popolazione (densità, etologia della specie, struttura della popolazione) (Anderson e May, 1978; May e Anderson, 1990; Toft e Aeschlimann, 1991). Questi parametri possono essere modificati da altri fattori, quali il sovraffollamento, la competizione intraspecifica e interspecifica, la malnutrizione, l'intervento dell'uomo, il contatto con animali domestici, inverni particolarmente rigidi; fattori che, interagendo tra loro, complicano la dinamica dell'interazione ospite-parassita e intervengono come fattori di rischio nell'insorgenza della malattia (Wobeser, 1994; Gulland, 1995). Soprattutto nello studio delle infezioni della fauna selvatica risultano inadatti e insufficienti i classici postulati che semplificano con il rapporto causa-effetto l'interazione agente infettivo-ospite.

La dinamica di trasmissione di un microparassita dipende sia dalla diffusione dell'infezione in una popolazione che da processi demografici attraverso cui la popolazione nel periodo post-epidemico ritorna suscettibile all'infezione (Hudson, 2002).

La dinamica di interazione di un microparassita con la propria popolazione ospite è spiegata attraverso un modello di tipo compartimentale, il cui diagramma di flusso può essere così rappresentato:



dove:

$S(t)$ = numero di recettivi di età a , al tempo t ;

$I(t)$ = numero di infetti di età a , al tempo t ;

$R(t)$ = numero di immuni di età a , al tempo t .

β = coefficiente di trasmissione. Definisce la frazione istantanea di recettivi che, in seguito ad un contatto con un infetto, acquisiscono l'infezione nell'unità di tempo. E' quindi un tasso caratteristico per ciascun agente patogeno all'interno di una popolazione e come tale di difficile valutazione. Per poterlo calcolare è necessario conoscere, in ogni istante ed esattamente, quanti sono gli individui infetti e quanti i recettivi, in una condizione dinamica di trasmissione dell'infezione, nell'unità di tempo e di spazio, in cui queste quantità variano continuamente e quanti sono i contatti tra S e I realmente utili al fine della trasmissione della malattia.

δ = tasso di guarigione: tasso istantaneo pro-capite di passaggio dallo stato infetto allo stato immune; definisce la frazione di infetti che guariscono e passano negli immuni nell'unità di tempo. Il suo reciproco corrisponde alla durata della malattia o tempo di guarigione.

Il numero totale di ospiti di età a , al tempo t , risulta dalla somma delle tre classi:

$$N(t) = S(t) + I(t) + R(t)$$

In termini matematici il numero di individui di ciascun compartimento viene definito impostando una equazione differenziale in funzione del tempo per ognuno dei tre compartimenti:

$$dS/dt = -\beta I(t)S(t)$$

$$dI/dt = \beta S(t)I(t) - \delta I(t)$$

$$dR/dt = \delta I(t)$$

Ogni infetto trasmette l'agente patogeno ad una frazione β dei recettivi S . Il primo comparto (recettivi) perde nell'unità di tempo un numero di soggetti pari a βSI ; il secondo comparto (infetti) li acquista mentre perde una frazione δR che corrisponde agli animali che guariscono, a loro volta acquisiti dal terzo comparto (immuni).

Un modello di questo tipo, estremamente semplificato, richiede alcuni assunti di base: nascite e morti naturali nella popolazione sono bilanciate, così che il numero di ospiti rimane costante; non si ha una mortalità additiva dovuta all'infezione. Se ad esempio gli immuni tornassero recettivi e se il compartimento degli infetti perdesse animali che muoiono per l'infezione, le equazioni subirebbero queste modifiche:

$$dS/dt = -\beta SI + \gamma R(t)$$

$$dR/dt = \delta I - \gamma R$$

dove:

γ = perdita dell'immunità;

$1/\gamma$ = durata media dell'immunità

Il tasso riproduttivo di base R_0 misura il massimo potenziale riproduttivo di un parassita tra una generazione e la successiva in una popolazione ed è un utile ed

importante parametro, nell'epidemiologia degli animali selvatici, per valutare se un parassita sia in grado di diffondere in una popolazione ospite (Hudson, 2002):

$$\beta = N / (a + v + \mu) \text{ dove:}$$

β = coefficiente di trasmissione;

N = popolazione ospite;

a = mortalità dell'ospite dovuta al parassita;

v = tasso di guarigione;

μ = mortalità naturale.

Il tasso riproduttivo di base R_0 di un agente patogeno in una popolazione ospite rappresenta il numero medio di infezioni secondarie che si producono quando un infetto viene immesso in una popolazione totalmente recettiva N (Dobson e Hudson, 1995). Se il numero di individui che diventano infetti è compensato dalla comparsa, per nascita, immigrazione o perdita dell'immunità, di nuovi individui recettivi e l'infezione produrrà, in media, un caso secondario, il tasso riproduttivo effettivo del patogeno sarà uguale a 1 ($R_0 = 1$) (Anderson e May, 1992).

Perchè l'infezione possa persistere nella popolazione, R_0 per definizione deve essere > 1 .

L'introduzione di pochi individui infetti in una comunità di recettivi non darà luogo ad un evento epidemico se il numero di recettivi non è superiore ad un valore critico o valore soglia (N_T); tale valore corrisponde al numero minimo di individui recettivi necessario perchè, all'introduzione dell'agente eziologico, si abbiano casi di infezione secondaria.

La condizione di esistenza e di persistenza di un'infezione ($R_o > 1$) è quella per cui la densità della popolazione ospite deve essere superiore al valore soglia N_T , quando $N > N_T$ (Thieme, 1992); il numero di individui infetti (all'equilibrio) dovrà essere elevato, significativamente più grande dell'unità, tale che non risenta di fluttuazioni stocastiche che impediscano la trasmissione e il mantenimento dell'infezione e portino la popolazione al di sotto della densità soglia (Anderson e May, 1992).

La forza di infezione λ , in modelli matematici di dinamica di infezione, rappresenta la probabilità nell'unità di tempo che un individuo suscettibile divenga infetto ed equivale al termine epidemiologico classico di "incidenza" (Anderson e May, 1992); dipende quindi dal tasso di contatto (numero medio di contatti, incontri tra individui nell'unità di tempo considerata), dalla probabilità che il contatto si realizzi con un individuo infetto, e dalla probabilità che si verifichi, al momento del contatto, la trasmissione dell'infezione.

Se un'infezione si trasmette per contatto diretto in una popolazione di dimensione costante N , λ è linearmente proporzionale al numero totale di individui infetti (Heesterbeek e Roberts, 1995):

$$\lambda = \beta I (t)$$

Il parametro λ esprime la relazione matematica esistente tra le caratteristiche intrinseche dell'agente eziologico e quelle della popolazione ospite e risente di tutti quei fattori che caratterizzano l'ospite, quali la struttura per classi di età ed i contatti precedenti con l'agente eziologico (Anderson e May, 1991).

In un modello di infezione in cui la trasmissione del patogeno si realizza per contatto diretto, il tasso di infezione λ dipende dal numero di contatti nell'unità di tempo e quindi dalla densità dei recettivi e degli infetti.

La costruzione di modelli di infezione che si basino sulla densità, piuttosto che su numeri assoluti, è preferibile per la immediata connessione della densità con la legge della azione di massa. La condizione sottintesa da questo principio è che la probabilità di contatto tra due individui nell'unità di tempo sia sempre la stessa in ogni unità di spazio (Heesterbeek e Roberts, 1995).

La particolare formulazione in cui λ è proporzionale alla densità degli infetti viene definita da de Jong *et al.* (1995) come vera azione di massa e la forza di infezione è data da :

$$\lambda = \beta I / N$$

Se la forza di infezione viene definita unicamente in termini di dimensione del compartimento di infetti parleremo di falsa azione di massa (Hudson, 2002) e la formula per definirla è:

$$\lambda = \beta I$$

La descrizione di un modello epidemico dipende da come la trasmissione dell'infezione è influenzata dalla dimensione della popolazione. In un modello che riflette la vera azione di massa, il tasso riproduttivo di base è indipendente dalla dimensione della popolazione; al contrario un modello basato sulla falsa azione di massa considera R_0 proporzionale ad N , così che esista un valore di N al di sotto del quale l'infezione non può realizzarsi (Hudson, 2002).

Per alcune popolazioni selvatiche, che estendono continuamente i propri limiti territoriali, la naturale unità che misura l'ecologia della popolazione è il numero di individui per unità di area mentre per altre è il numero totale di individui; una volta identificata la variabile rilevante è possibile valutare come questa influenzi il tasso di contatto (Hudson *et al.*, 2002). Aumentando la densità o la dimensione della

popolazione aumenterà il tasso di contatto. Un incremento del tasso di contatto può verificarsi per aumento del numero di individui, assumendo che l'area occupata dagli stessi rimanga costante, o per la formazione raggruppamenti di individui (per ragioni sociali, comportamentali o alimentari), assumendo che sia l'area che la dimensione della popolazione rimangano costanti. In entrambi i casi è preferibile applicare il modello di falsa azione di massa.

Al contrario, se la crescita della popolazione è associata ad un aumento sia del numero di individui che dell'area occupata, il tasso di contatto non ne risulta significativamente influenzato (Hudson *et al.*, 2002).

Modelli densità dipendenti che influenzano la natalità e la mortalità dell'ospite influenzano l'efficacia di differenti metodi di controllo di un'infezione (Barlow, 1996). Quando il controllo di una malattia, in una popolazione di animali selvatici, è finalizzato alla riduzione del rischio di infezione o all'eradicazione della stessa, risulta importante valutare non solo la prevalenza dell'infezione nella popolazione selvatica ma anche il numero effettivo di individui infetti che possono trasmettere la malattia.

L'introduzione del concetto di frequenza dei possibili contatti realizzabili tra individui di una stessa popolazione è legata alla possibilità che la distribuzione degli animali sulla superficie considerata sia ineguale, pur rimanendo costante la densità. Perché β descriva realmente l'andamento dell'infezione, devono essere valutati diversi scenari biologici, corrispondenti a quattro tipi di trasmissione dipendente dalla densità e dalla frequenza in popolazioni in cui i contatti siano omogenei o eterogenei. La definizione di β solo sulla base della densità non permette di distinguere se una sua variazione dipenda dalla variazione del numero degli ospiti o della superficie occupata dagli stessi; tanto più che valutare l'area realmente utilizzata da una popolazione di selvatici risulta problematico; per esempio raddoppiando il numero di animali non è detto che raddoppi la densità, i nuovi individui possono occupare spazi non utilizzati in precedenza dagli altri.

5.1.3.3 *Allestimento del modello matematico*

Sono stati sviluppati due modelli matematici di simulazione della dinamica di infezione da virus LPAI e da virus HPAI H5N1, e su di essi applicato il campionamento previsto dalla sorveglianza (attiva e passiva) dell'influenza aviaria nelle popolazioni selvatiche in Italia e Europa.

È stato allestito un modello matematico che simulasse una condizione di endemia da virus LPAI, utilizzando i parametri d'infezione e demografici reperibili nel lavoro di Guberti *et al.* (2007), e riportati in tabella 9. I parametri demografici quali il tasso di mortalità naturale e di reclutamento sono stati ricavati da fonti bibliografiche (Cramp e Simmons, 1977; Hammack *et al.*, 1976; Kalchreuer, 1996; Mihelson *et al.*, 1982). La durata del periodo infettante è stata fissata a 14 giorni (EFSA, 2005; Hinshaw *et al.*, 1980), mentre il calcolo del parametro epidemiologico più importante, il coefficiente di trasmissione β , è stato possibile sulla base dei risultati di un'indagine virologica e sierologica sulla circolazione del virus LPAI H1N1 in anatre catturate (De Marco *et al.*, 2003; De Marco *et al.*, 2004), dai quali risultava un valore medio dell'incidenza invernale pari a 25% (I.C. 95% 11,4-38,6). L'incidenza pro-capite può ritenersi equivalente alla forza di infezione (λ), che rappresenta la probabilità di un individuo recettivo di infettarsi. Per un'infezione trasmessa per via diretta, il numero di nuovi casi dipende dal numero di recettivi e di infetti moltiplicato per il coefficiente di trasmissione: $\lambda = \text{incidenza} = \beta SI$. Calcolando il numero di infetti (I) seguendo la tecnica di Muench (1959), è stato possibile ricavare il valore del coefficiente di trasmissione con la formula $\beta = \lambda/I$.

Tab. 9 - Parametri demografici e di infezione utilizzati nel modello
(Guberti *et al.*, 2007)

<i>Parametro</i>	<i>Valore nel modello</i>
<i>Immunità</i>	90 giorni
<i>Mortalità naturale adulti</i>	20% / anno
<i>Mortalità nuovi nati</i>	20% / anno
<i>Tasso di reclutamento</i>	3 / anno
<i>Coefficiente di trasmissione</i>	0,0002
<i>Periodo infettante</i>	14 giorni
<i>Capacità portante</i>	5000
<i>Prelievo venatorio invernale</i>	40%

Gli assunti del modello sono: il coefficiente di trasmissione è costante; la durata dell'immunità è almeno pari a 3 mesi; l'immunità persiste per tutta la vita dell'individuo in una condizione di endemia; la pseudo-azione di massa è vera (Guberti *et al.*, 2007).

Utilizzando gli stessi parametri demografici riferiti alle popolazioni ospiti coinvolte, è stato poi sviluppato un modello di infezione che simulasse l'evoluzione epidemica dell'infezione a seguito dell'introduzione del virus HPAI H5N1 in una popolazione selvatica recettiva. Considerando che mancano studi epidemiologici relativi all'infezione da virus HPAI H5N1 nei volatili selvatici nel bacino del Mediterraneo sono stati utilizzati gli stessi parametri descritti per il modello di infezione da virus LPAI, ed inserita la mortalità indotta dall'infezione. Come già accennato nel capitolo precedente, il tasso di letalità da virus H5N1, mancando stime valide ottenute dagli episodi di mortalità in popolazioni a vita libera, è stato ricavato da studi sperimentali effettuati su Germani reali (Hulse-Post *et al.*, 2005; Sturm-Ramirez *et al.*, 2005) ed è stato definito pari al 50% di letalità entro 4 giorni dall'infezione.

I modelli sono stati sviluppati su un arco temporale di 270 giorni, corrispondenti al periodo compreso tra giugno e marzo, durante il quale avviene il passo e l'arrivo nelle zone di sosta e svernamento della maggior parte degli uccelli migratori, e che di conseguenza è da considerarsi il periodo a rischio per l'introduzione dei virus influenzali.

Per ottenere una variabile utile alla valutazione dell'efficacia delle diverse forme di sorveglianza, è stata ricavata la variabile *PROB* che rappresenta la probabilità di evidenziare almeno una positività tra i soggetti campionati. Sono numerosi gli studi che hanno come oggetto la probabilità di rilevamento di infezioni nella fauna selvatica (Moilanen, 2002; Gu e Swihart, 2004). Hanley e Lippman-Hand (1983) nel loro lavoro attribuiscono un ruolo di massima importanza alla stima del limite superiore dell'intervallo di confidenza per il calcolo della probabilità di rilevare una positività per eventi rari, tra i quali si possono includere le infezioni con livelli di prevalenza molto bassi (sull'ordine di numero di individui infetti per 1.000 campioni testati), com'è il caso dell'infezione da virus influenzali soprattutto in certi periodi dell'anno.

Per semplicità, si assume che il test utilizzato per la rilevazione del virus è perfetto, vale a dire che ha sensibilità e specificità pari al 100%, e che soggetti infetti e soggetti sani hanno la stessa probabilità di essere campionati.

La probabilità di rilevamento (P) di eventuali individui infetti in un campione N viene quindi calcolata sulla base della seguente formula:

$$P = 1 - (1 - r)^N$$

dove r è il tasso riproduttivo di base dell'infezione, che viene ricavato dal modello per il periodo e la condizione epidemiologica specificati. Naturalmente più r è piccolo, più bassa risulterà la probabilità P di rilevare un soggetto infetto

per un determinato campione di dimensione N . La metodica utilizzata è ripresa da un lavoro sulla sorveglianza dell'infezione da Arbovirus nel lavoro di Gu e Novak (2004).

Per valutare l'influenza dei parametri più importanti su tale probabilità, è stata calcolata la sensibilità secondo la tecnica proposta da Keeling e Gilligan (2000). La sensibilità misura i cambiamenti nella variabile analizzata conseguenti a piccole modifiche del parametro testato, ed è uguale all'unità quando la variabile è proporzionale al parametro, assume valori elevati quando i cambiamenti della variabile sono grandi rispetto a quelli del parametro, e si avvicina allo zero nel caso opposto.

Per valutare l'efficacia delle attività di sorveglianza in relazione allo sforzo campionario profuso, è stata calcolata la variabilità della probabilità di identificazione del virus nei soggetti campionati in rapporto alle variazioni dei tassi di prelievo venatorio e di cattura. L'influenza che possono avere diversi sforzi campionari sulla probabilità di rintracciare gli individui positivi, e quindi sull'efficacia delle attività di sorveglianza, è stata valutata attraverso il calcolo della sensibilità della probabilità di identificazione del virus nei soggetti campionati a variazioni del tasso giornaliero di prelievo venatorio e di cattura degli uccelli oggetto del campionamento. La variabilità a cui possono essere soggetti il tasso di caccia e di cattura è stata ricavata dalla letteratura. In particolare, è stato ipotizzata una percentuale di prelievo con l'attività venatoria compresa tra il 20 e il 60% (Kalchreuter, 1990), ed una variabilità dell'efficacia di cattura dal 5 al 35% (dati INFS non pubblicati, 2004).

Infine, partendo dal calcolo del tasso giornaliero di evidenziazione della circolazione virale nel periodo considerato, si è quantificato anche in termini temporali l'efficacia delle diverse forme di sorveglianza in caso di endemia e di epidemia, chiedendo al modello di calcolare il tempo (espresso in giorni) necessario alla rilevazione di almeno un soggetto infetto in risposta a variazioni della

numerosità della popolazione oggetto della sorveglianza (per una percentuale di campionamento pari al 2%, stima realistica della effettiva percentuale di campionamento raggiunta dal piano nazionale di monitoraggio) e della percentuale di campionamento (in una meta-popolazione composta da 10.000 individui). Per definire le variazioni dello sforzo campionario da inserire nel modello ci si è basati sull'analisi dei risultati del piano nazionale di monitoraggio relativi agli anni 2006-2008, resi disponibili dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (vedi capitolo 'Materiali e metodi'), e si è ipotizzata una percentuale di campionamento compresa tra l'1% e il 10%.

5.2 RISULTATI

5.2.1 *Studio sui tassi di rilevamento dell'infezione*

Dall'analisi sono stati ottenuti i tassi giornalieri di evidenziazione del virus attraverso le diverse forme di campionamento, riferiti all'infezione LPAI e HPAI.

Nelle tabelle 10 e 11 sono riportati i tassi calcolati per un'infezione ad andamento endemico (prevalenza attesa 5%) sostenuta da virus dell'influenza aviaria a bassa patogenicità relativi alle tre forme di campionamento previste dal piano di monitoraggio (uccelli abbattuti, catturati, morti) e raggruppati per forma di sorveglianza (attiva, passiva).

In tabella 12 e 13 sono riportati con i medesimi criteri i tassi giornalieri calcolati per un'infezione da virus HPAI H5N1 (prevalenza attesa 2%), sul cui tasso di rinvenimento di un soggetto positivo tra quelli trovati morti incide significativamente la mortalità causata dall'infezione.

Tab. 10 - Tassi giornalieri di evidenziazione di un soggetto infetto tra quelli campionati per LPAI (prevalenza virale 5%)

<i>Campionamento</i>	<i>Tasso giornaliero</i>
Uccelli abbattuti durante la stagione venatoria	0,000074
Uccelli catturati	0,000046
Uccelli rinvenuti feriti o morti	0,000056

Tab. 11 - Tassi giornalieri di evidenziazione di un soggetto infetto tra quelli campionati per LPAI (prevalenza virale 5%) in base al tipo di sorveglianza

<i>Tipo di sorveglianza</i>	<i>Tasso giornaliero</i>
Sorveglianza attiva	0,00012
Sorveglianza passiva	0,000056

Tab. 12 - Tassi giornalieri di evidenziazione di un soggetto infetto tra quelli campionati per HPAI (prevalenza virale 2%)

<i>Fonte del campione</i>	<i>Tasso giornaliero</i>
Uccelli abbattuti durante la stagione venatoria	0,000030
Uccelli catturati	0,000019
Uccelli rinvenuti feriti o morti	0,0025

Tab. 13 - Tassi giornalieri di evidenziazione di un soggetto infetto tra quelli campionati per HPAI (prevalenza virale 2%) in base al tipo di sorveglianza

<i>Tipo di sorveglianza</i>	<i>Tasso giornaliero</i>
Sorveglianza attiva	0,000049
Sorveglianza passiva	0,0025

I tassi calcolati forniscono già una prima indicazione della probabilità di rinvenimento di individui infetti tra tutti quelli campionati, e mostrano come mentre in una situazione di endemia da virus dell'influenza aviaria a bassa patogenicità la sorveglianza attiva si rivela più efficace di quella passiva, il risultato si ribalta nel caso il campionamento sia rivolto all'evidenziazione di virus ad alta patogenicità (figure 22 e 23).

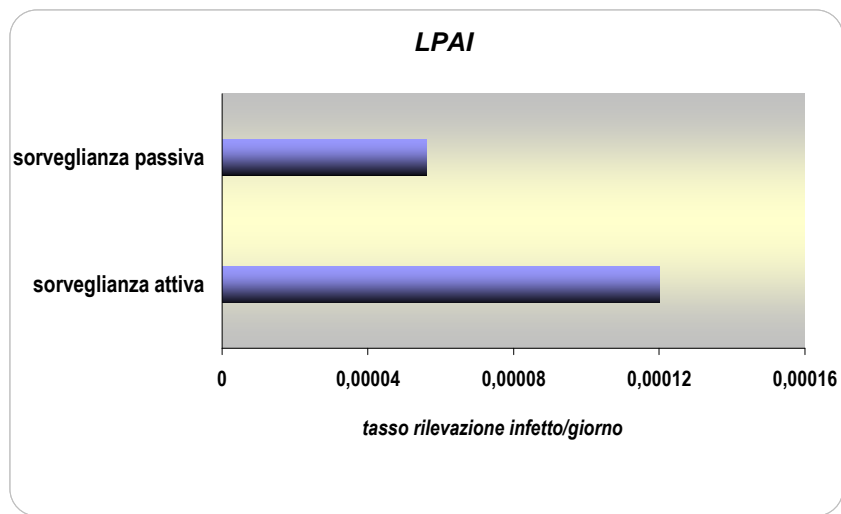


Fig. 22 - Tasso giornaliero di rilevazione della circolazione di virus LPAI attraverso le attività di sorveglianza passiva e attiva

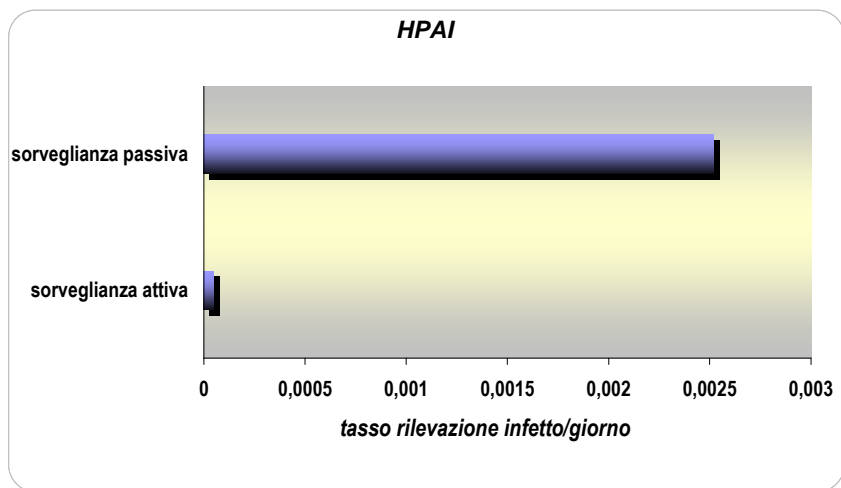


Fig.23 - Tasso giornaliero di rilevazione della circolazione di virus HPAI attraverso le attività di sorveglianza passiva e attiva

Per una lettura più rapida e chiara dei risultati, è inoltre possibile confrontare i tassi calcolati attraverso gli *ODDS ratio* di tali tassi. Nelle indagini epidemiologiche gli *ODDS* sono rapporti tra le frequenze osservate e servono a quantificare una probabilità relativa. Un *ODDS ratio* > 1 indica una probabilità relativa positiva,

cioè il primo termine del rapporto ha una probabilità maggiore del secondo termine. Nelle tabelle 14 e 15 sono riportati, riferiti all'infezione da LPAI e HPAI H5N1, gli *ODDS ratio* risultanti dal confronto tra i metodi di campionamento utilizzati e le probabilità relative di identificazione della circolazione virale di un metodo rispetto ad un altro.

Tab. 14 - LPAI: *ODDS ratio* e probabilità relative di identificazione del virus negli uccelli campionati

<i>Fonte del campione</i>	<i>ODDS ratio</i>	<i>Probabilità relativa</i>
Abbattuti vs catturati	1,6	61,5%
Catturati vs abbattuti	0,62	- 38,5%
Trovati morti vs catturati	1,2	54,5%
Trovati morti vs cacciati	0,75	- 42,8%

Tab. 15 - HPAI: *ODDS ratio* e probabilità relative di identificazione del virus negli uccelli campionati

<i>Fonte del campione</i>	<i>ODDS ratio</i>	<i>Probabilità relativa</i>
Abbattuti vs catturati	1,6	61,5%
Catturati vs abbattuti	0,62	- 38,5%
Trovati morti vs catturati	136,2	99,3%
Trovati morti vs cacciati	85,1	98,8%

Il campionamento degli animali abbattuti durante l'attività venatoria risulta sempre più efficace del campionamento su animali catturati, che si rivela la forma di monitoraggio meno conveniente. Nell'infezione da virus a bassa patogenicità il campionamento degli uccelli cacciati è più efficace anche di quello su volatili trovati morti, mentre nell'infezione da virus ad alta patogenicità H5N1 la raccolta delle carcasse di soggetti morti si rivela senza alcun dubbio la più efficace, risultando in una probabilità di rintracciare un individuo infetto del 98% superiore

rispetto al campionamento su individui abbattuti, e del 99% superiore al campionamento su uccelli catturati.

Il significato dei risultati ottenuti può essere ulteriormente chiarito e contestualizzato se espresso in termini di numero di soggetti infetti campionati ogni giorno. Riferiamo così i tassi calcolati ad una meta-popolazione oggetto di campionamento composta da 10.000 anatidi. Nel caso della circolazione di virus a bassa patogenicità, ipotizzando una prevalenza virale costante del 5%, le attività di sorveglianza passiva e attiva risutano in un tasso giornaliero di rilevamento di 0,74 volatili infetti/giorno tra gli abbattuti, 0,46/giorno tra i catturati e 0,56/giorno tra gli animali trovati morti. Questo significa che nella ipotetica sub-popolazione considerata, abbattendo una media giornaliera di circa 26 individui al giorno (tasso di prelievo venatorio pari al 40%/stagione venatoria), si ricava la probabilità di rintracciare tra di essi un soggetto positivo al tasso di 0,74 al giorno, che si traduce nella probabilità di rilevare almeno 2 positività in tre giorni di caccia (ogni 80 capi abbattuti). Traslando lo stesso ragionamento sui tassi di rilevamento negli animali catturati e trovati morti, in una meta-popolazione di 10.000 individui nella quale vengono catturati circa 9 animali al giorno, e muoiono per cause naturali circa 11 uccelli al giorno, si ottiene una probabilità di rilevamento di almeno una positività ogni 30 animali catturati (3 giorni o sessioni di catture con un'efficacia pari al 25%) ed ogni 20 uccelli morti (circa 2 giorni, per un tasso di mortalità naturale pari al 20%/anno).

Con questi risultati, risulta evidente come le attività di sorveglianza attiva, che comprendono il campionamento su volatili abbattuti e catturati, si traducono in un'efficienza nel rilevamento della circolazione da virus LPAI maggiore (in una popolazione di 10.000 individui, è possibile evidenziare più di un soggetto infetto al giorno, e più di 8 soggetti positivi ogni settimana) rispetto alla sorveglianza passiva, in grado di rilevare circa 1 soggetto positivo ogni 2 giorni, quindi meno di 4 alla settimana.

Se passiamo a valutare il risultato dei medesimi calcoli applicati all'infezione da virus HPAI H5N1 (ipotizzando una prevalenza virale costante del 2% ed un tasso di letalità pari al 50%), si nota come il tasso di rilevamento attraverso la sorveglianza attiva (pari a 0,000049/giorno) si traduce, in una popolazione di 10.000 volatili, nella probabilità di rilevare una positività ogni due giorni (su circa 60 uccelli abbattuti e circa 20 catturati), mentre il tasso giornaliero di rilevamento con la sorveglianza passiva è pari a 0,0025, il che significa che su 36 uccelli morti ogni giorno (per cause naturali e a seguito dell'infezione), 25 sono positivi.

Le considerazioni appena esposte hanno un valore relativo e utile al confronto tra le varie forme di campionamento, ma non possono fornire una valutazione realistica riguardo ai tempi e al numero di campioni necessari alla rilevazione precoce della circolazione virale. Una ragione su tutte: suppongono una percentuale di campionamento pari al 100%, che presupporrebbe la raccolta, tra sorveglianza attiva e passiva, di centinaia di migliaia di campioni ogni anno. Per una trattazione più attinente alla realtà e utile alla quantificazione dello sforzo campionario necessario si rimanda al paragrafo successivo, dove vengono esposti i risultati della modellizzazione.

5.2.2 *Modello matematico*

Il modello di dinamica di infezione da virus LPAI restituisce un andamento endemico dell'infezione, con una prevalenza media di periodo pari all'1,8% (I.C. 95% 0,2% - 3,4%), come rappresentato in figura 24.

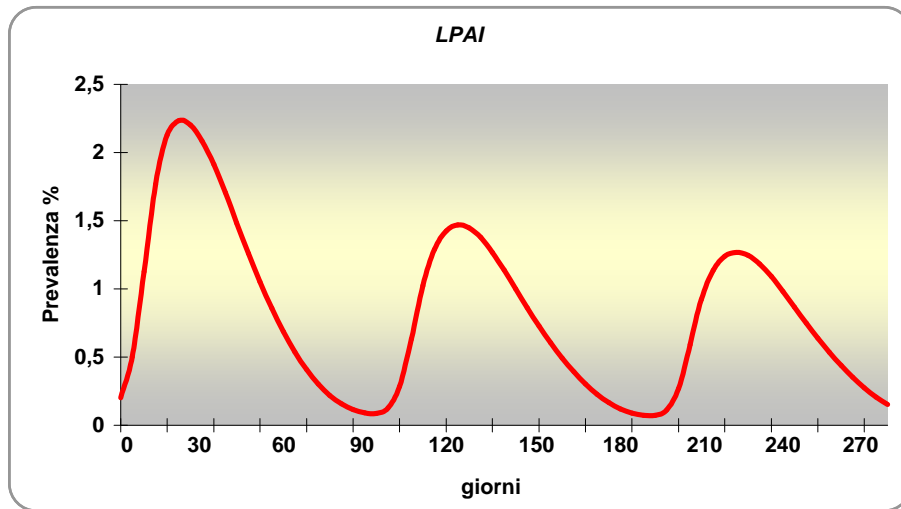


Fig. 24 - Andamento simulato dal modello della prevalenza virale per l'infezione LPAI

Per una meta-popolazione di 10.000 individui (in Italia una ventina di zone umide ospitano nel periodo autunno-invernale più di 10.000 uccelli acquatici svernanti, dati INFS 2002) il modello restituisce un andamento del numero di soggetti infetti, rappresentato graficamente in figura 25 rapportato all'andamento della numerosità della popolazione.

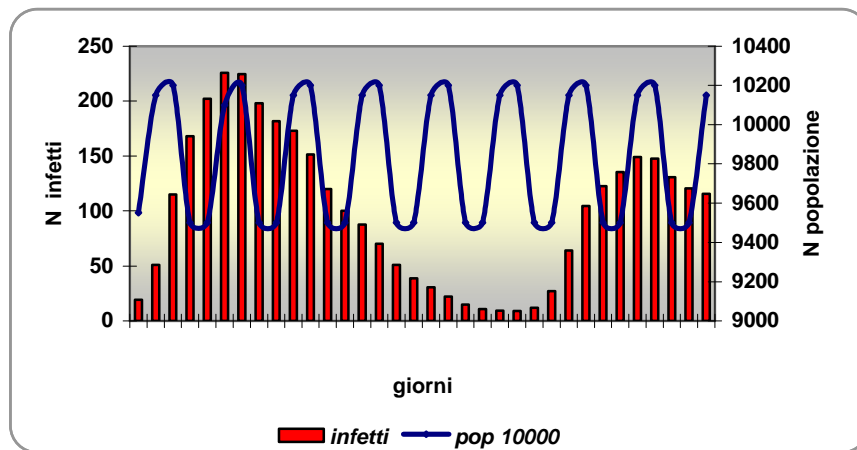


Fig. 25 - Andamento del numero di uccelli infetti da virus LPAI (barre) e della consistenza della meta-popolazione (linea) nel tempo

Nella stessa popolazione, dalla modellizzazione otteniamo il numero giornaliero dei volatili infetti tra quelli abbattuti, catturati e trovati morti. Il risultato è riportato in figura 26.

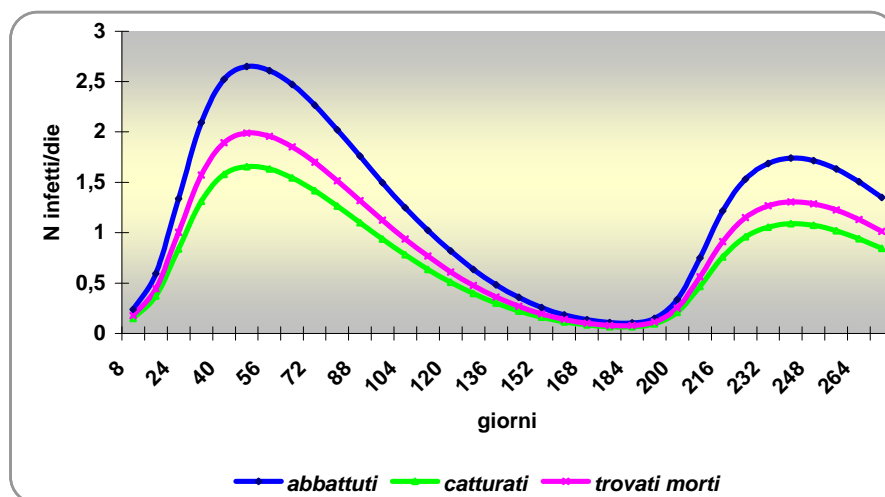


Fig. 26 - Andamento del n° di infetti da LPAI tra gli animali abbattuti, catturati e trovati morti in una ipotetica meta-popolazione composta da 10.000 individui

Nella tabella 16 è riportato il valore medio di periodo della probabilità di evidenziare almeno un individuo positivo tra quelli campionati (vedi capitolo 'Materiali e metodi'), e calcolata all'interno del modello come variabile denominata *PROB*. Ricercando il virus in uccelli abbattuti si ha all'incirca 1,5 probabilità su 100 di trovare una positività (quindi grosso modo la probabilità di rilevare un individuo infetto su 60 campionati), mentre la probabilità si abbassa (meno di una su 100) nel caso del campionamento su soggetti catturati o trovati morti. In figura 27 è rappresentato graficamente l'andamento della probabilità su base giornaliera.

Tab. 16 - Modello: probabilità media di evidenziazione di un soggetto infetto tra quelli campionati per LPAI

<i>Campionamento</i>	<i>PROB</i>	<i>I.C. 95%</i>
Uccelli abbattuti durante la stagione venatoria	0,00147	0,00049-0,00245
Uccelli catturati	0,00075	0,00019-0,00130
Uccelli rinvenuti feriti o morti	0,00089	0,00022-0,00156

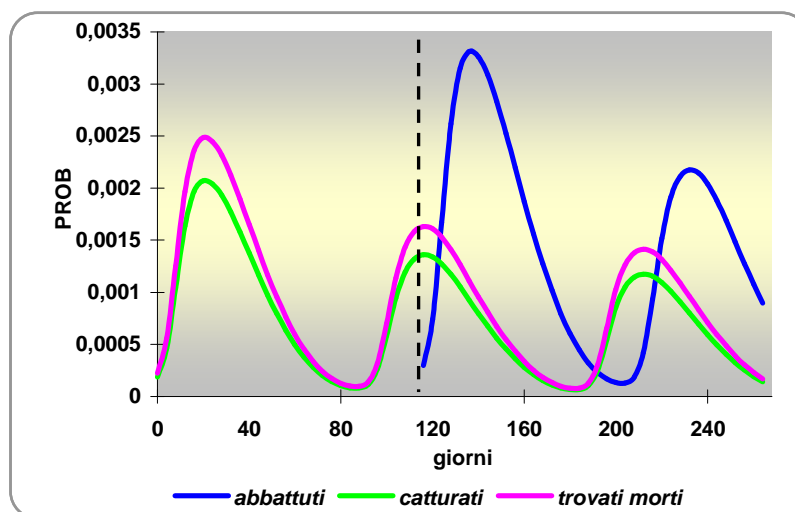
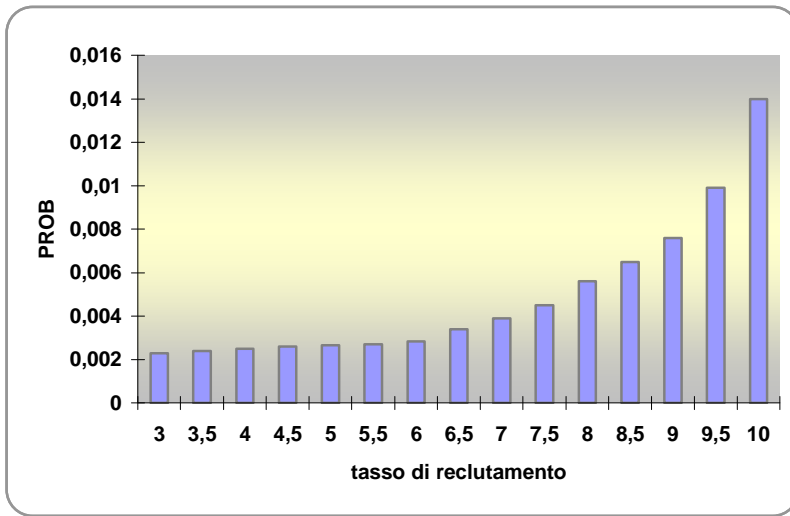
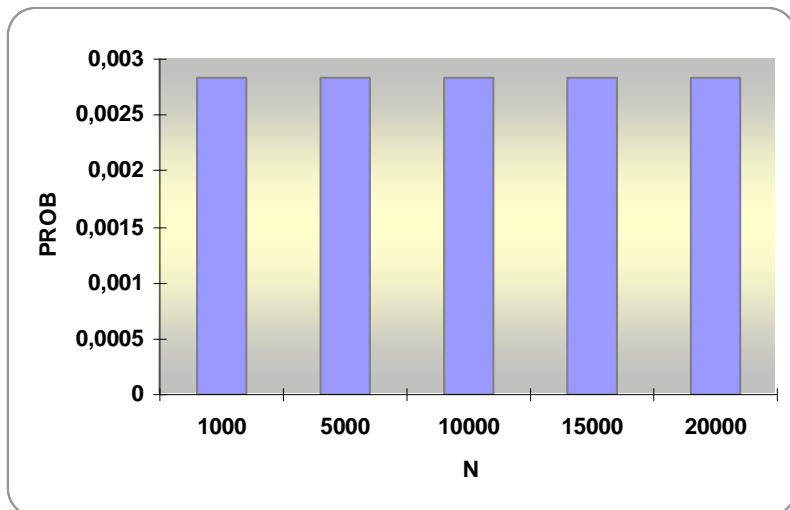


Fig 27 - Simulazione dell'andamento della probabilità di rilevazione di un individuo positivo tra i campionati nel periodo considerato. La linea tratteggiata indica l'inizio della stagione venatoria

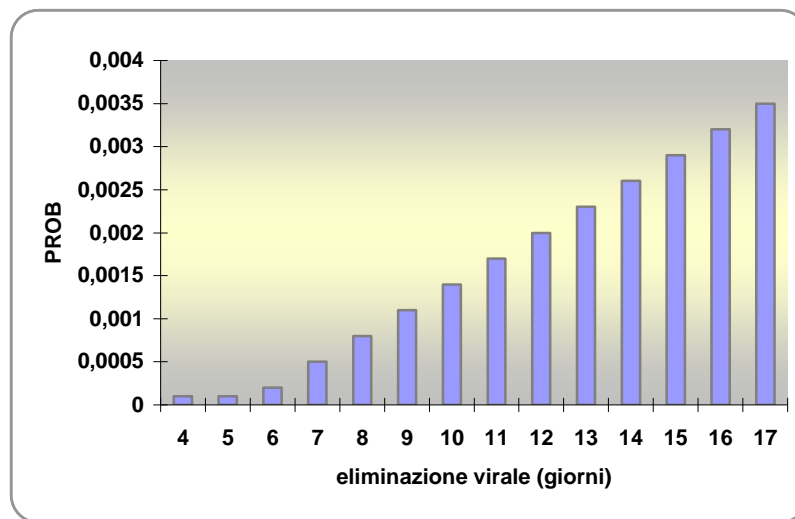
Per comprendere quali parametri epidemiologici e demografici siano in grado di modificare la probabilità di evidenziazione precoce della circolazione virale nelle popolazioni indagate, si è proceduto al calcolo della sensibilità della variabile *PROB* alla variazione della dimensione della popolazione campionata, del tasso di reclutamento, che influenza la proporzione di individui giovani nella comunità, e della durata dell'eliminazione virale. Si riportano i risultati nei grafici a barre delle figure 28a, 28b e 28c.



a



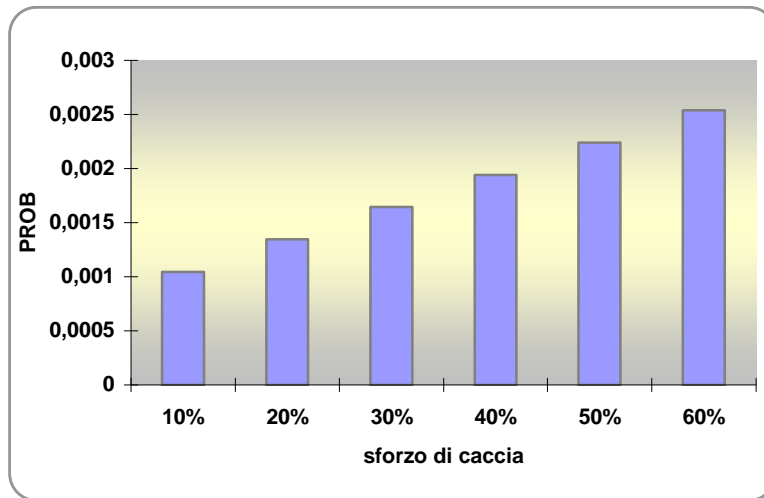
b



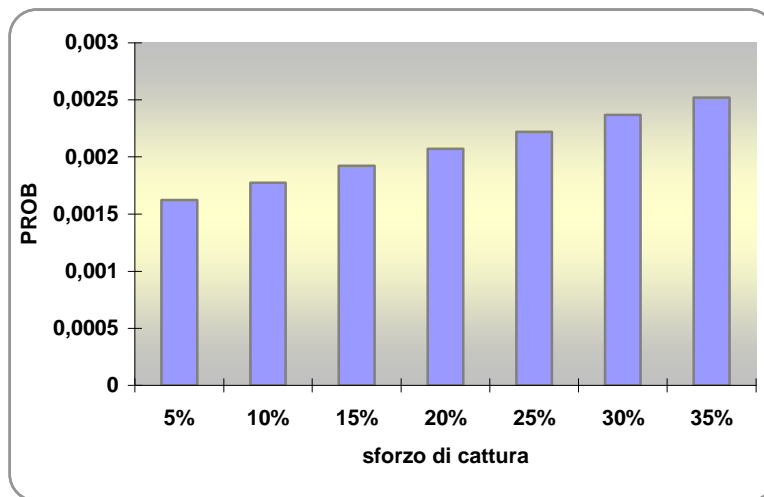
c

Fig. 28 - Effetto di tasso di reclutamento (a), numerosità della popolazione N (b) e durata dell'eliminazione virale (c) sulla probabilità di evidenziazione di positività

L'influenza che possono avere diversi sforzi campionari sulla probabilità di rintracciare gli individui positivi, e quindi sull'efficacia delle attività di sorveglianza, è stata valutata attraverso il calcolo della sensibilità della variabile *PROB* a variazioni del tasso giornaliero di prelievo venatorio e di cattura degli uccelli oggetto del campionamento. La variabilità a cui possono essere soggetti il tasso di caccia e di cattura è stata ricavata dalla letteratura. In particolare, è stato ipotizzata una percentuale di prelievo con l'attività venatoria compresa tra il 20 e il 60% (Kalchreuter, 1990), ed una variabilità dell'efficacia di cattura dal 5 al 35% (dati INFS non pubblicati, 2004). I risultati sono illustrati nelle figure 29a e 29b.



a



b

Fig. 29 - Effetto dello sforzo di caccia (a) e di cattura (b) sulla probabilità di evidenziazione di positività attraverso la sorveglianza attiva

Per lo sviluppo del modello relativo all'infezione da virus HPAI H5N1 si è ipotizzata una introduzione del virus nelle popolazioni selvatiche in primavera, cioè all'inizio del periodo considerato, e in tarda estate-inizio autunno, basandosi sull'ipotesi dell'introduzione del virus H5N1 attraverso i movimenti migratori dei

volatili acquatici. Il modello di dinamica di infezione restituisce un andamento epidemico tipico degli agenti eziologici caratterizzati da elevata letalità e basso coefficiente di trasmissione, incapaci di persistere nella popolazione ospite e che mostrano quindi un picco della prevalenza seguito da una rapida estinzione dell'infezione, come rappresentato in figura 30.

La prevalenza media in tutto il periodo (270 gg) risulta pari allo 0,17% (I.C. 95% 0% - 0,8%), mentre nell'arco temporale in cui il virus circola nella popolazione ospite la prevalenza media è pari all'1,1% (I.C. 95% 0%-1,7 %).

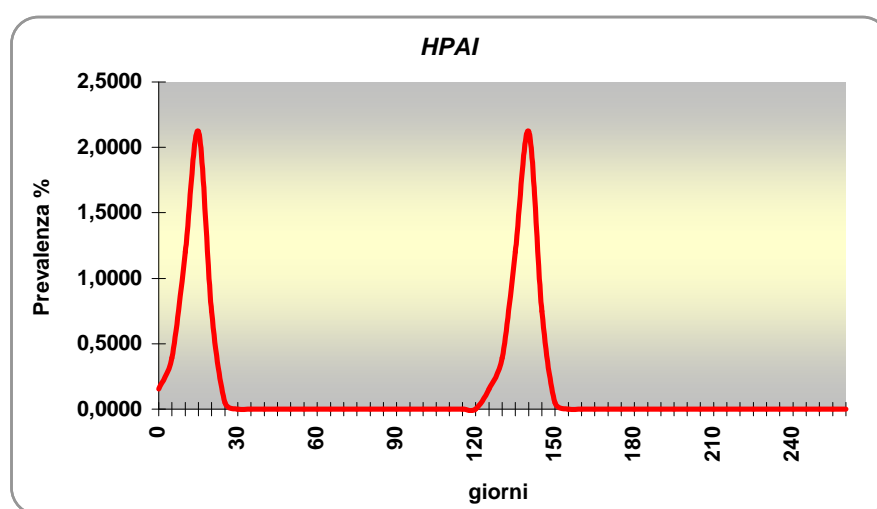


Fig. 30 - Andamento simulato dal modello della prevalenza virale per l'infezione LPAI

Per valutare l'andamento della consistenza degli individui infetti in rapporto al trend demografico della popolazione, si è ipotizzata una consistenza iniziale della meta-popolazione recettiva pari a 10.000 individui, e il risultato è rappresentato graficamente in figura 31.

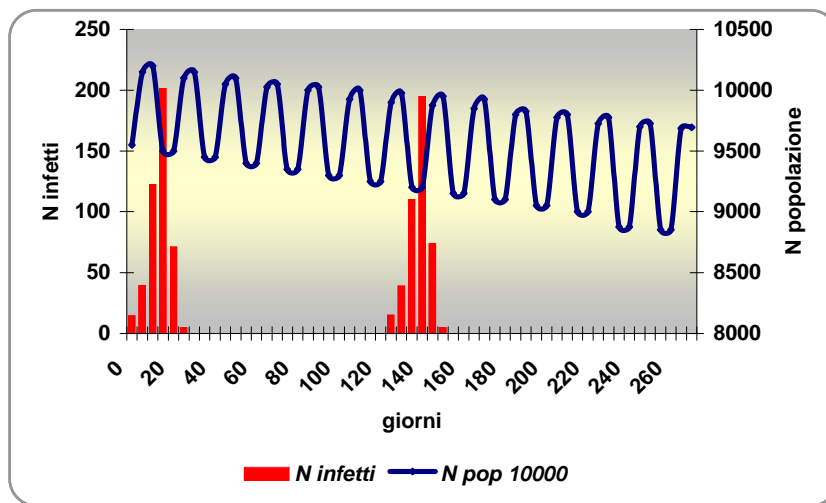


Fig. 31 - Andamento del numero di uccelli infetti da virus HPAI (barre) e della consistenza della meta-popolazione (linea) nel tempo

In tabella 17 è riportato il valore medio di periodo della probabilità di evidenziare almeno un individuo positivo tra quelli campionati, all'interno del modello denominata *PROB*. Ricercando il virus in uccelli abbattuti o catturati si hanno all'incirca 0,01 probabilità su 1000 di trovare una positività, quindi la probabilità di trovare un soggetto infetto su 100.000, praticamente una probabilità nulla. Le maggiori probabilità di rilevare la circolazione del virus HPAI (circa una probabilità su 1000, che aumentano fin quasi al 3% se il campionamento avviene durante il picco epidemico) si hanno campionando gli uccelli trovati morti, risultato della somma tra gli individui morti per cause naturali e gli individui morti a seguito dell'infezione. In figura 32 è rappresentato graficamente l'andamento della probabilità su base giornaliera.

Tab. 17 - Modello: probabilità media di evidenziazione di un soggetto infetto tra quelli campionati per HPAI

<i>Campionamento</i>	<i>PROB</i>	<i>I.C. 95%</i>
Uccelli abbattuti durante la stagione venatoria	0,0000115	0,00000-0,00155
Uccelli catturati	0,0000094	0,00000-0,000025
Uccelli rinvenuti feriti o morti	0,00128	0,0000-0,00271

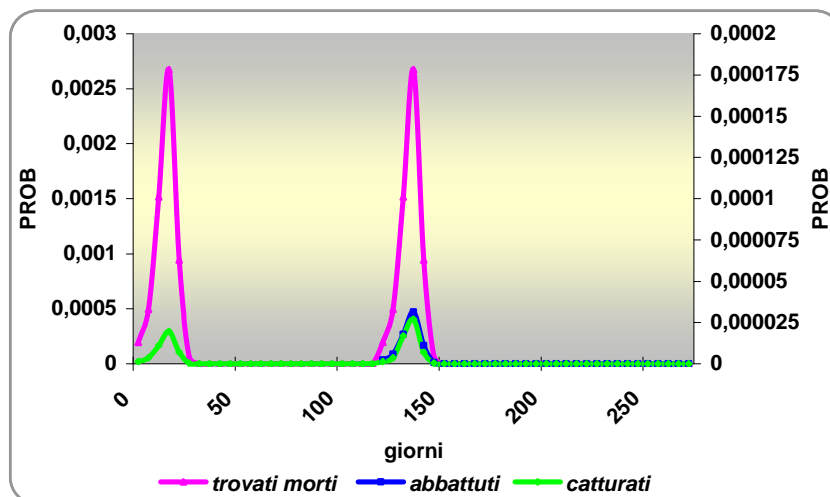


Fig. 32 - Simulazione dell'anadamento della probabilità di rilevare un soggetto positivo tra quelli campionati con diverse attività di sorveglianza.

Dalla simulazione si comprende come il mezzo di rilevazione più efficace della circolazione del virus H5N1 all'interno di una popolazione di anatidi selvatici sia il monitoraggio dei volatili morti, che presenta una probabilità di evidenziazione precoce di un soggetto infetto circa 1000 volte superiore alle altre due forme di sorveglianza attiva messe insieme. Inoltre, dai risultati della simulazione emerge come un fattore critico per definire l'efficacia delle attività di monitoraggio sia quello temporale. Per chiarire meglio come la tempistica del campionamento influisca sulla probabilità di evidenziare delle positività tra i soggetti campionati, ed in particolar modo tra gli uccelli rinvenuti morti, si è valutata la relazione tra probabilità di successo (cioè probabilità di evidenziare almeno un soggetto infetto)

e momento del campionamento (cioè arco temporale intercorso tra l'introduzione del virus nella meta-popolazione oggetto della sorveglianza e prelievo dei campioni, espresso in giorni). Il risultato è rappresentato in figura 33.

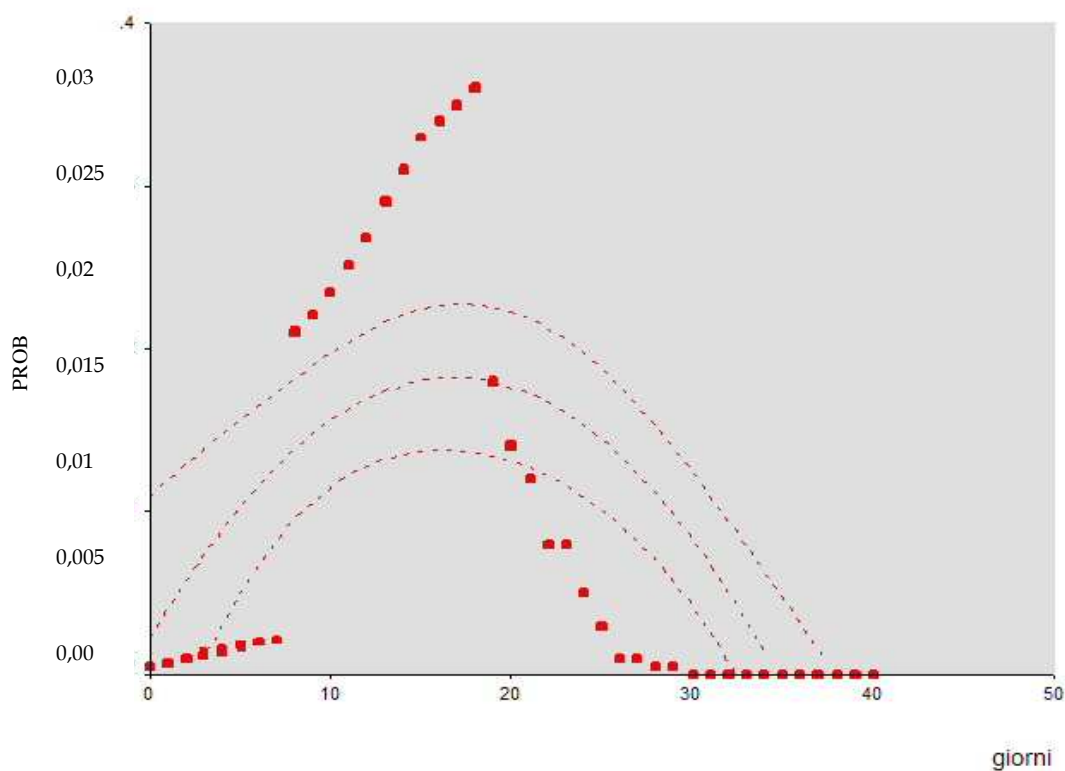


Fig. 33 - Scatterplot della probabilità di rilevazione del virus HPAI H5N1 vs giorni trascorsi dall'introduzione del virus nelle meta-popolazione oggetto del campionamento.

La probabilità di rilevazione della circolazione virale, legata al fattore temporale da una relazione non lineare (*quadratic regression* $R^2 = 0,898$), cresce fino a 19 giorni dopo l'introduzione del virus per poi calare rapidamente ed arrivare a valori prossimi allo zero tra il 30° e il 40° giorno successivi all'introduzione del virus nella popolazione.

Poiché dal modello allestito risulta che la probabilità di evidenziazione precoce della circolazione virale è strettamente collegata al rinvenimento di soggetti morti,

risulta evidente come la mortalità causata dall'infezione rivesta un ruolo importante nella valutazione dell'efficacia dei metodi di sorveglianza. Per approfondire questo aspetto si sono analizzate le modifiche nell'andamento della prevalenza virale durante un ciclo epidemico al variare del tasso di letalità in un range compreso tra il 10% e il 50%, e si riporta il risultato dell'analisi nel grafico di figura 34.

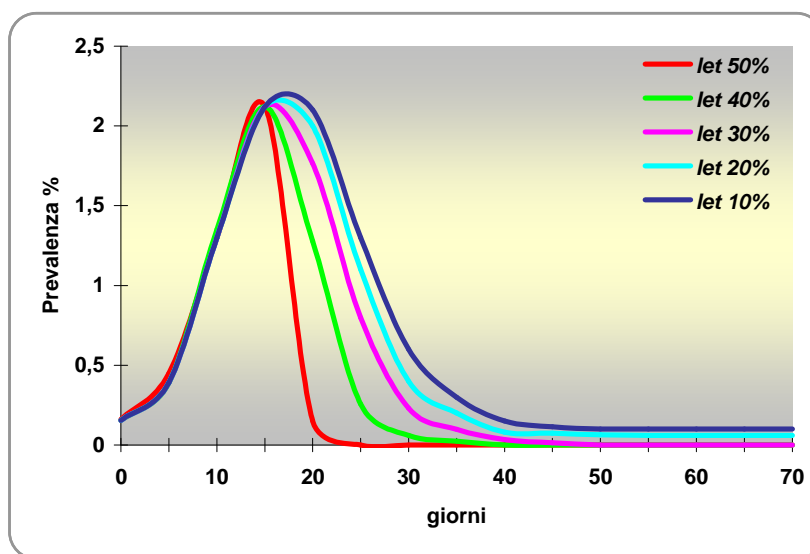
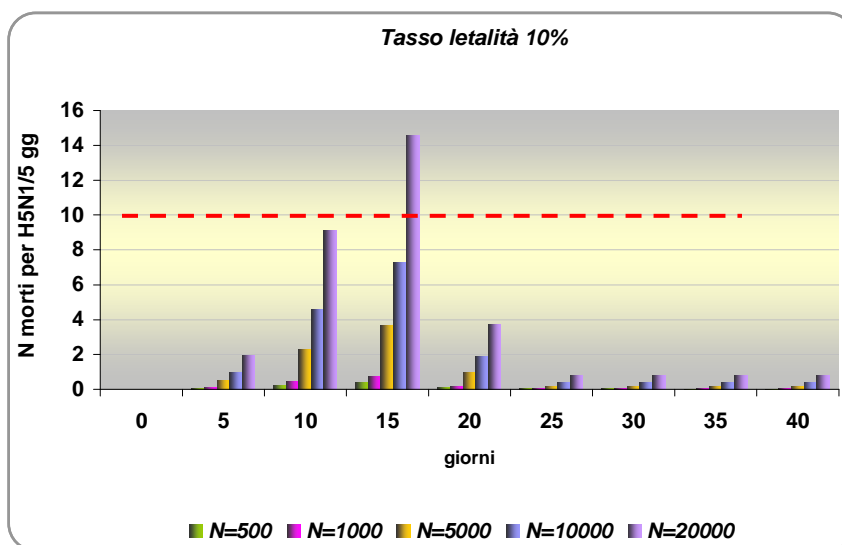


Fig. 34 - Effetto di diversi tassi di letalità sull'andamento della prevalenza virale

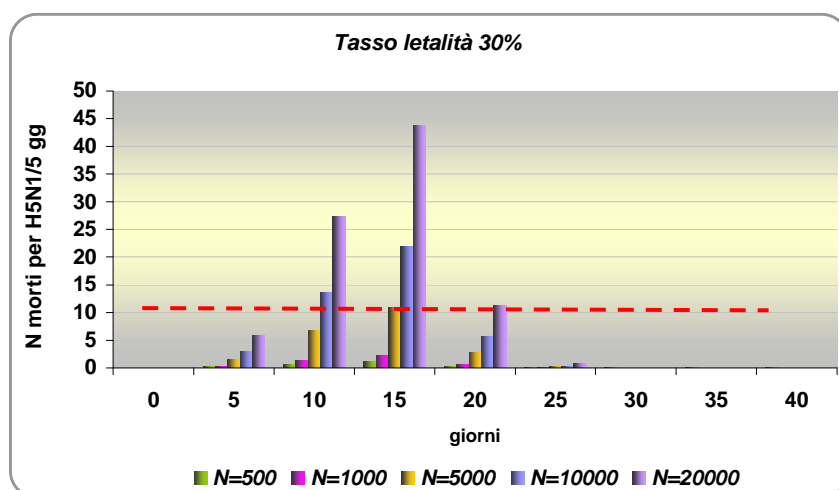
Ipotizzando un tasso di letalità pari o superiore al 30% l'infezione si diffonde nella popolazione e si estingue in un periodo compreso tra i 23 e i 45 giorni dopo l'introduzione del virus, mentre con tassi di mortalità pari o inferiore al 20% l'infezione persiste, seppur a livelli di prevalenza virale molto bassi (per un tasso di letalità pari al 20%, prevalenza virale: 0,11%; per un tasso di letalità pari al 10%, prevalenza virale: 0,19%).

Per ricavare ulteriori indicazioni sulle possibilità di intervento utile alla rilevazione della circolazione del virus H5N1 a seguito di un episodio di mortalità segnalato in

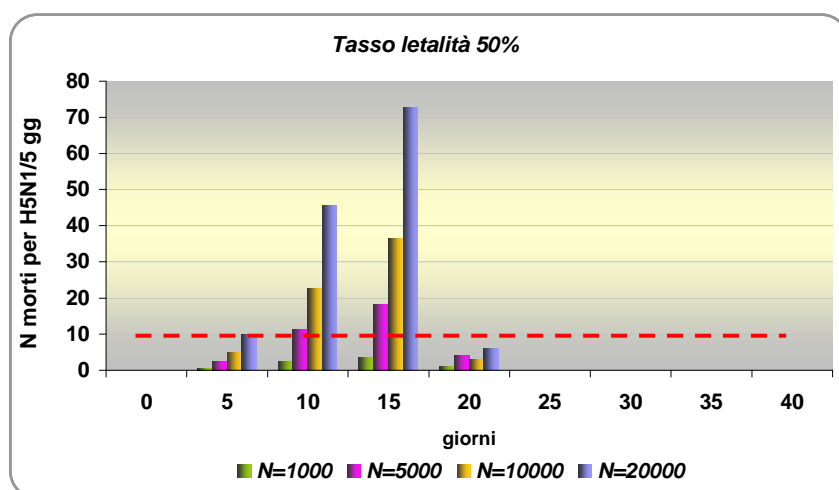
volatili selvatici si è ricavato il numero di uccelli morti a seguito dell'infezione nell'unità di tempo, per diverse dimensioni della popolazione oggetto della sorveglianza (N compreso tra 5.000 e 20.000/die) e per diversi tassi di letalità (range 10%-50%). La FAO ha proposto pari a 10 a settimana il numero minimo di anatidi trovati morti nella medesima località collegati con una probabilità molto elevata alla presenza del virus H5N1, quindi utili all'attivazione immediata delle misure di *Early Detection* rivolte all'evidenziazione della circolazione virale. Si è utilizzato questo valore di riferimento per valutare per quali tassi di letalità in subpopolazioni di anatidi di numerosità variabile fosse possibile sospettare la circolazione virale attraverso la segnalazione di episodi di mortalità. I valori restituiti dal modello sono rappresentati graficamente nei grafici della figura 35.



a



b



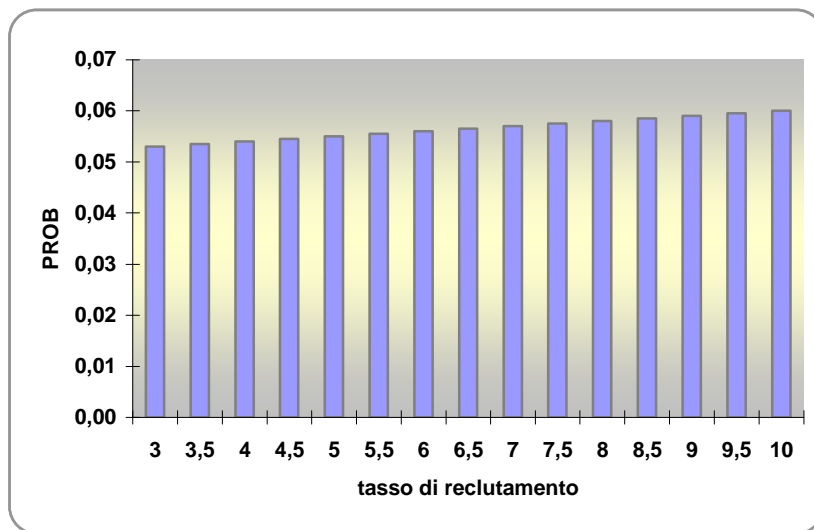
c

Fig. 35 - Numero di anatidi morti a seguito dell'infezione da virus HPAI H5N1 ogni 5 giorni in popolazioni di diversa dimensione per variabili tassi di letalità (a: 10%; b: 30%; c: 50%). La linea rossa tratteggiata indica il livello di rilevazione utile all'attivazione delle misure di *Early Detection*

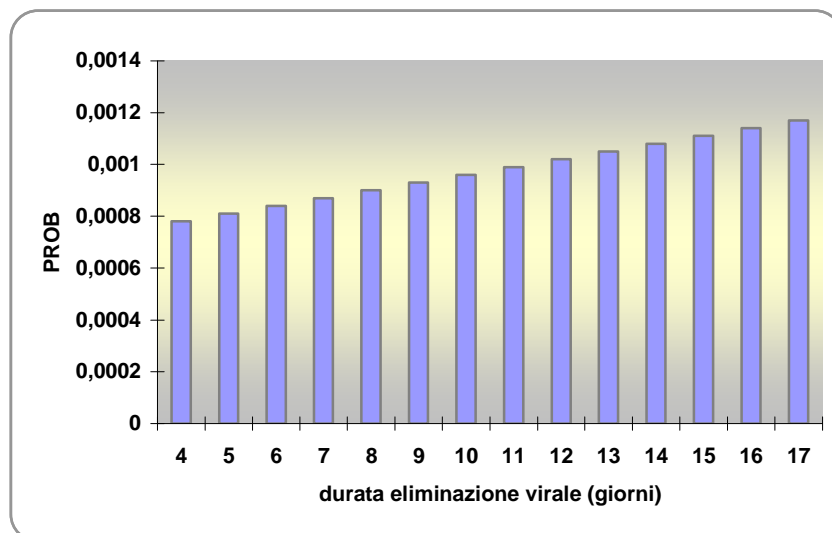
Per un tasso di letalità pari al 10%, solo in una meta-popolazione composta giornalmente da 20.000 individui (in Italia circa una decina di zone umide ospitano ogni anno una simile comunità svernante) il numero di uccelli trovati morti a

seguito dell'infezione può risultare utile all'attivazione di uno stato di allerta. In condizioni epidemiologiche differenti, caratterizzate da tassi di letalità pari al 30 e al 50%, l'infezione tende ad estinguersi prima di dar luogo a episodi di mortalità rilevanti in comunità inferiori ai 1000 individui, mentre il numero di soggetti morti a seguito dell'infezione supera la quota di 10/settimana in meta-popolazioni composte da più di 5.000 individui. Le mortalità in tutti i casi si concentrano tra i 5 e i 18 giorni successivi all'introduzione del virus nella popolazione ospite, ed il numero di soggetti morti potenzialmente rilevabili nel corso del monitoraggio è significativo in un intervallo di tempo breve, inferiore alla settimana.

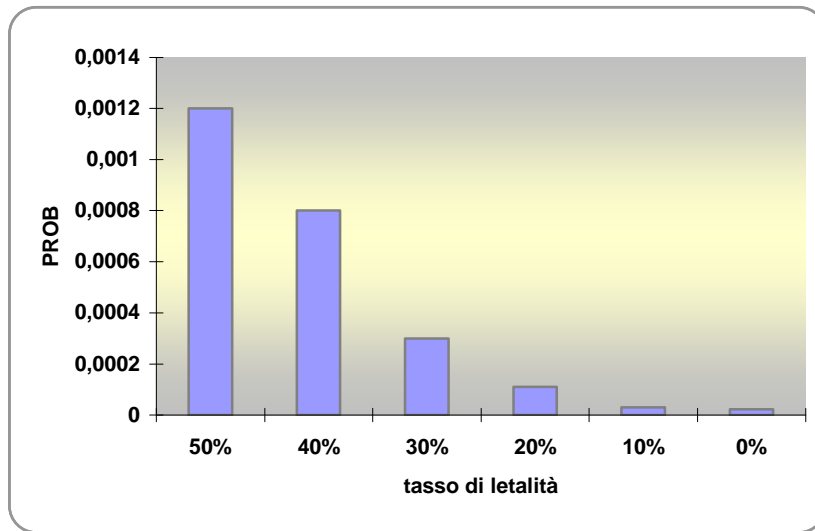
Il calcolo del valore di sensibilità della probabilità di evidenziazione precoce della circolazione virale (*PROB*) alla variazione di alcuni parametri demografici ed epidemiologici indica come essa non venga influenzata in maniera significativa né da variazioni del tasso di reclutamento né da variazioni della durata dell'eliminazione virale. Al contrario il tasso di letalità si dimostra un parametro in grado di indurre cambiamenti significativi nella probabilità di rilevazione di positività virali tra i soggetti campionati, incidendo non solo sulla prevalenza virale e sulla probabilità di estinzione dell'infezione, ma soprattutto sul numero di individui infetti che muoiono e possono essere raccolti durante l'attività di sorveglianza passiva. I risultati esposti sono riportati come grafici a barre nelle figure 36a, 36b e 36c.



a



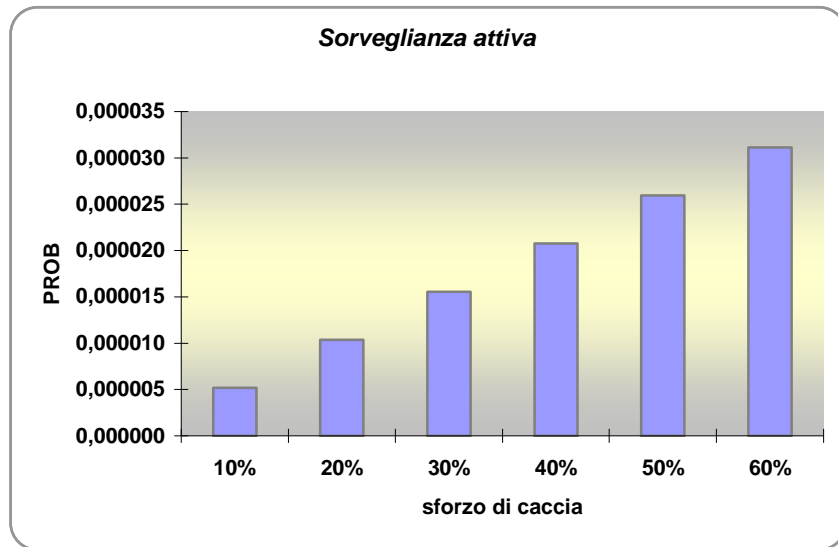
b



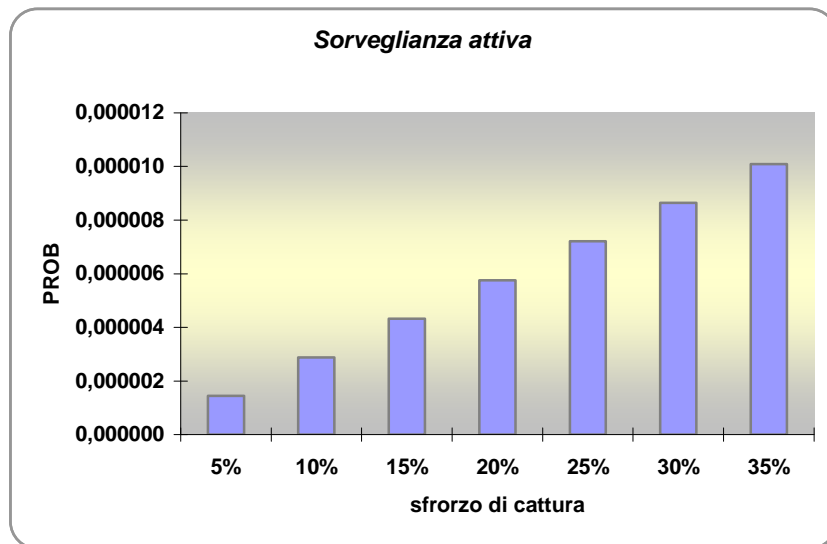
c

Fig. Effetto di tasso di reclutamento (a), durata dell'eliminazione virale (b) e tasso di letalità (c) sulla probabilità di evidenziazione di positività virologiche

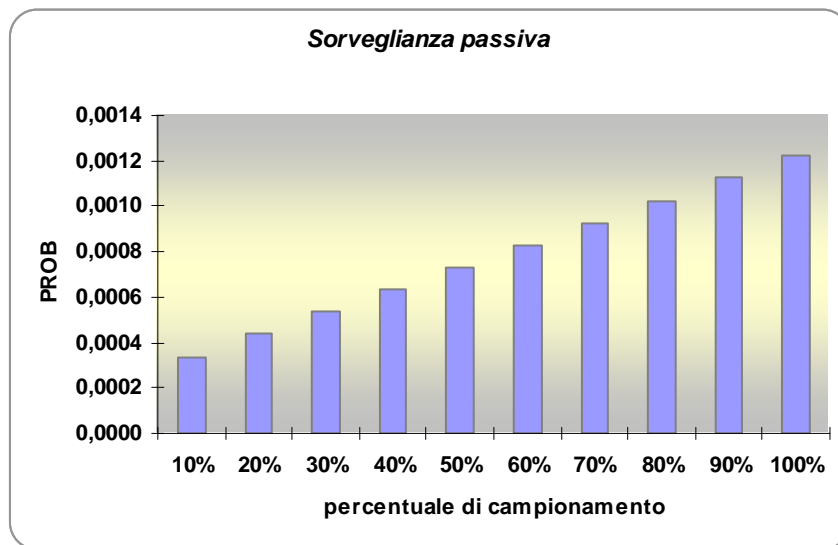
L'influenza che possono avere diversi sforzi campionari sulla probabilità di rintracciare gli individui positivi, e quindi sull'efficacia delle attività di sorveglianza, è stata valutata attraverso il calcolo della sensibilità della variabile a variazioni del tasso giornaliero di prelievo venatorio e di cattura degli uccelli oggetto del campionamento, oltre che a diverse percentuali di campionamento degli individui rinvenuti morti. La variabilità a cui possono essere soggetti il tasso di caccia e di cattura è stata ricavata dalla letteratura. In particolare, è stato ipotizzata una percentuale di prelievo con l'attività venatoria compresa tra il 20 e il 60% (Kalchreuter, 1990), ed una variabilità dell'efficacia di cattura dal 5 al 35% (dati INFS non pubblicati, 2004). I risultati sono illustrati nelle figure 37a, 37b e 37c.



a



b



c

Fig. 37 - Effetto dello sforzo di caccia (a) di cattura (b) e della percentuale di campionamento (c) su volatili trovati morti sulla probabilità di evidenziazione di positività attraverso la sorveglianza attiva

Aumentando lo sforzo di prelievo venatorio e di cattura aumenta proporzionalmente anche la probabilità di identificazione di animali positivi, ma rimane a valori così bassi (probabilità di rilevare 0,035 e 0,012 positività su 1.000 campioni rispettivamente per uno sforzo di caccia pari al 60% e per uno sforzo di cattura pari al 35%) che può considerarsi nulla in rapporto al grande, e forse inapplicabile, sforzo campionario richiesto.

Naturalmente la percentuale di campionamento su animali morti incide significativamente sulla probabilità di evidenziare il virus H5N1, risulta interessante valutare quanto: se raccogliendo ed esaminando tutte le carcasse rinvenute la probabilità di trovarne uno infetto è di poco superiore a una su mille, tale valore si dimezza per una percentuale di campionamento del 40%, e diventa circa una su 2.500 se si rinvengono o raccolgono solo un 10% dei soggetti morti in totale.

La considerazione successiva riguarda lo sforzo campionario necessario al

raggiungimento di tali percentuali di campionamento, e se tale sforzo sia effettivamente realizzabile. Nel trattare di dimensioni campionarie, nel caso oggetto dello studio, la difficoltà maggiore risiede nel tentativo di valutare la reale consistenza della popolazione da campionare, trattandosi non di una popolazione residente e chiusa, ma di una comunità continuamente soggetta a variazioni della consistenza e della composizione, e fortemente influenzata da movimenti di immigrazione e di emigrazione che modificano periodicamente la quota di soggetti recettivi potenzialmente esposti all'infezioni e disponibili per il campionamento. Basandosi sui dati di censimento della popolazione di uccelli acquatici svernanti ottenuti dalle attività dell'*International Waterbird Census* (Wetlands International, 2002), la popolazione totale di uccelli acquatici svernanti in Italia viene stimata su 1.000.000 di individui. Riferendosi alla specie più frequentemente campionata e che presenta le maggiori prevalenze per virus influenzali LPAI, il Germano Reale (*Anas platyrinchos*), la stima derivante dal censimento invernale organizzato da Wetland *International* e coordinato dall'ISPRA nel mese di gennaio riporta una consistenza media per gli anni 2002-2007 di 186.000 individui. Se ipotizziamo di effettuare un campionamento pari al 10%, otteniamo un numero di campioni pari a 17.600, che consiste in circa il doppio del numero di campioni conferiti al Centro di Referenza Nazionale presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie nel 2006 (8.188 campioni) e nel 2007 (7.652 campioni), e quasi quattro volte il numero raggiunto nel 2008 (4.383 campioni). Considerando, oltretutto, che i campioni conferiti provengono da diverse specie di anatidi e da altre specie di uccelli selvatici, è evidente che per effettuare una valutazione più attinente alla realtà è necessario ipotizzare una percentuale di campionamento molto inferiore.

Considerando che nelle stagioni 2005/2006 e 2006/2007 i campioni conferiti ai laboratori di referenza riconosciuti come provenienti da anatidi selvatici sono risultati rispettivamente 4.503 e 4.141, sembra plausibile inserire nel calcolo una percentuale di campionamento pari al 2%, che applicata alla popolazione di Germano si traduce in un campione costituito da circa 3.500 unità/anno.

Con una tale percentuale di campionamento, mentre la sorveglianza attiva rileva la circolazione del virus H5N1 in un periodo superiore ai 200 giorni, la sorveglianza passiva consente di evidenziare una positività in una ventina di giorni di campionamento.

5.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Lo studio che ha analizzato l'efficacia delle diverse azioni di monitoraggio attraverso il semplice calcolo del tasso di rilevazione giornaliero del virus negli animali campionati, pur presentando limiti evidenti dovuti alla estrema semplificazione di tutte le dinamiche coinvolte, riesce a fornire una prima indicazione della diversa efficienza dei metodi di campionamento applicati alla sorveglianza dell'influenza aviaria in popolazioni selvatiche. Per rendere più comprensibile il significato dei tassi ottenuti si è deciso di applicarli ad una subpopolazione composta da 10.000 individui rilevando che, per virus a bassa patogenicità, la probabilità di rilevare un soggetto positivo è una al giorno con le attività di sorveglianza attiva (abbattimento e cattura di animali apparentemente sani) ed una ogni 2 giorni sottoponendo alla ricerca del virus tutte le carcasse di uccelli morti rinvenuti con le attività di sorveglianza passiva; per virus ad alta patogenicità, caratterizzati da una circolazione del virus a livelli più bassi (prevalenza virale: 2%), il tasso di rilevamento attraverso la sorveglianza attiva si traduce nella probabilità di rilevare un animale infetto ogni due giorni, mentre con la sorveglianza passiva risultano positivi 25 dei 36 volatili trovati morti (per cause naturali e a seguito dell'infezione) ogni giorno. Questa prima valutazione dei risultati, che per facilità di lettura viene effettuata su una popolazione di numerosità nota e presupponendo un campionamento della totalità dei soggetti disponibili, necessita di un approccio critico che ne definisca i limiti. Pur rivelandosi estremamente utile ad una migliore comprensione dei risultati ottenuti, l'applicazione dei tassi calcolati ad una popolazione di consistenza nota è da considerarsi un esercizio sostanzialmente teorico. E' necessario ribadire, infatti, come i valori ottenuti dalla prima fase di elaborazione statistica siano valori relativi, utili al confronto tra le forme di campionamento, ma non ad una valutazione quantitativa dello sforzo campionario (in termini di numerosità del campione e di tempi di attuazione), per la quale si rimanda alla discussione sui risultati delle simulazioni del modello matematico.

Ritornando ai risultati dello studio, dal calcolo degli *ODDS ratio* e delle probabilità relative risulta evidente come le attività di sorveglianza attiva, che comprendono il campionamento su volatili abbattuti e catturati, sono più efficaci nel rilevamento della circolazione virale rispetto alle attività di sorveglianza passiva in condizioni di epidemia da virus LPAI. Al contrario, nell'infezione da virus HPAI H5N1 la mortalità aggiuntiva dovuta all'infezione modifica significativamente i tassi giornalieri relativi alle diverse metodologie di campionamento, così che la sorveglianza passiva, che prevede la raccolta degli individui morti, si rivela la forma di campionamento più efficiente nella rilevazione della circolazione del virus (con oltre il 98% delle probabilità in più rispetto al campionamento su individui catturati e abbattuti). Pur con i limiti già sottolineati, in questa analisi preliminare emergono già aspetti interessanti quali una diversa efficacia delle forme di sorveglianza a seconda dell'obiettivo dell'indagine (valutazione del livello di circolazione di virus LPAI VS evidenziazione precoce dell'introduzione del virus HPAI H5N1 nelle popolazioni ospiti) e l'importanza della mortalità associata all'infezione HPAI nell'influenzare l'efficacia del campionamento attuato.

La maggiore efficienza di rilevazione riscontrata per la sorveglianza passiva rispetto all'attiva nel caso di infezione da virus HPAI H5N1 trova riscontro nelle evidenze di campo che testimoniano la mancata rilevazione di virus ad alta patogenicità in animali sani tra i 100.000 campioni raccolti in Europa o le migliaia conferiti al Centro Nazionale di Referenza italiano ogni anno, e la constatazione che l'identificazione dei focolai da H5N1 HPAI in Europa sia avvenuta unicamente a seguito del rinvenimento di animali morti (SANCO, 2007). In Italia, nel corso del piano nazionale di monitoraggio per l'anno 2006, non sono state rilevate positività per virus H5N1 tra i 9.415 campioni prelevati da specie selvatiche (dei quali 3.136 da anatidi) da uccelli sani nel corso della sorveglianza attiva, mentre è stato isolato il virus nel 45% dei campioni conferiti come sospetti per influenza aviaria (su 42 sospetti, 19 positivi per H5N1, in particolare 16 cigni, 1 pollo sultano, 1 poiana e 1 germano). In ambito extra-europeo solamente uno studio ha dimostrato l'isolamento

di HPAI H5N1 da uccelli acquatici apparentemente sani, ed in particolare da sei anatre comprese fra gli oltre 4,000 uccelli campionati in Cina, in un'area adibita all'allevamento di anatre domestiche (Chen *et al.*, 2006). Parallelamente, in Italia come in Europa la forma più efficace per indagare la prevalenza dei virus influenzali tipo A si è rivelata la sorveglianza attiva su uccelli catturati e abbattuti (SANCO, IZSVenezie).

Tali valutazioni risentono inevitabilmente di un'approssimazione che non tiene conto di diverse variabili, ad esempio la località in cui avvengono gli episodi di mortalità (se in vicinanza di zone abitate il rinvenimento di uccelli morti è più probabile), o la specie coinvolta. Ad esempio, il ruolo che i cigni hanno rivestito nel corso dell'epidemia europea del 2006 è probabilmente il risultato di un'alta recettività, dimostrata anche in studi sperimentali, combinata ad una aumentata probabilità di essere rinvenuti dopo la morte rispetto ad uccelli più piccoli e meno appariscenti, le cui carcasse possono essere rapidamente rimosse da predatori e spazzini. Inoltre i cigni tendono a vivere vicino ad aree più densamente abitate, fatto che chiaramente ne facilita il ritrovamento.

La modellizzazione matematica che simula l'infezione da virus LPAI restituisce valori di prevalenza (1,8%, I.C. 95% 0,2%-3,4%) sostanzialmente compatibili con quelli rilevati nel corso di indagini e monitoraggio svolti in Europa, dove nel 2006 è stata rilevata una prevalenza media nei volatili selvatici pari all'1,46% (SANCO, 2007), ed in Italia, quando nel corso del 2007 e del 2008 la prevalenza della circolazione di virus influenzali tipo A è stata rilevata pari, rispettivamente, al 2,1% e all'1,9% (IZSVenezie).

La modellizzazione della dinamica di infezione dei virus influenzali nelle popolazioni oggetto di indagine ha permesso di seguire l'evoluzione, nell'arco temporale prescelto, della numerosità dei comparti di individui recettivi, infetti ed immuni sulla base di parametri demografici e di infezione che ne regolano i cambiamenti nel tempo. Il modello restituisce un quadro che conferma i risultati

preliminari ottenuti nella prima fase dello studio, assegnando alla probabilità media di rilevare almeno un individuo positivo tra i campionati un valore superiore per la sorveglianza attiva rispetto alla sorveglianza passiva. Inoltre fornisce un'indicazione sull'andamento nel tempo di tale probabilità di evidenziazione del virus, che presenta un picco minore nei mesi primaverili ed un incremento significativo ($\chi^2 = 6,433$, $p < 0,05$) nei mesi tardo-autunnali (settembre-dicembre). Questo andamento è spiegabile in parte dalla dinamica del numero di soggetti infetti nel tempo, in parte dall'incremento nel periodo settembre-dicembre del numero di soggetti abbattuti nel corso della stagione venatoria, che rappresentano la fonte più probabile di rilevazione di positività. L'andamento osservato va a sovrapporsi a quello osservato in Europa non solo relativo all'intensità di campionamento, ma anche alla distribuzione delle positività rilevate nei volatili selvatici nei diversi mesi dell'anno (vedi figura 38). In particolare, i dati resi disponibili dalla Commissione Europea sui piani di monitoraggio dei diversi Paesi membri segnalano che l'88% delle positività per virus LPAI H5 è stato rilevato tramite la sorveglianza attiva su volatili vivi o abbattuti (per il 91,2% in anatidi di superficie), e che la maggior parte di queste positività (65%) sono state segnalate nel periodo compreso tra settembre e dicembre.

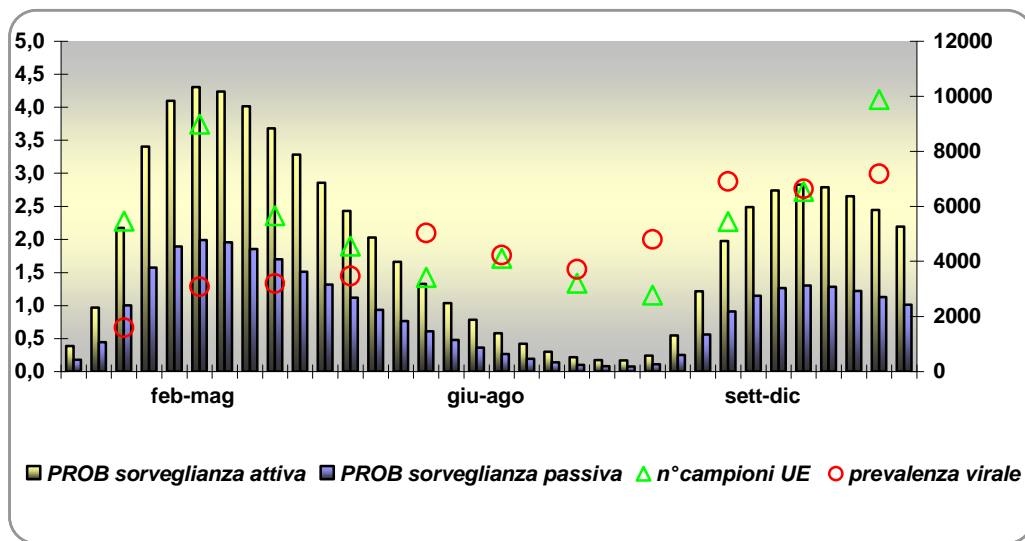


Fig. 38 - La probabilità di rilevazione di positività (var *PROB*) ricavata dal modello di simulazione per sorveglianza attiva e passiva viene sovrapposta all'andamento del numero di campioni raccolti e della prevalenza da virus LPAI nei Paesi UE nel 2006

L'analisi della sensibilità mostra come la probabilità di evidenziazione di soggetti infetti sia influenzata in maniera significativa sia da variazioni del parametro demografico che definisce il tasso di reclutamento, sia da variazioni del parametro che determina la durata dell'eliminazione virale. Un tasso di reclutamento maggiore, influenzando direttamente la consistenza del contingente degli individui giovani nella popolazione nel periodo post-riproduttivo, ha ripercussioni dirette sulla dinamica dell'infezione. I *pattern* stagionali della prevalenza virale dell'influenza aviaria nei volatili selvatici confermano l'ipotesi secondo la quale gli individui giovani rappresentano il serbatoio principale dell'infezione. (Webster *et al.*, 1992; Olsen *et al.*, 2006). I nuovi nati formano una popolazione interamente recettiva nella quale il virus può diffondersi nella stagione tardo estiva, e rispetto agli adulti presentano alte incidenze d'infezione e alti tassi di eliminazione virale (Hinshaw *et al.*, 1980; 1985). Premesso questo, un aumento del tasso di reclutamento della popolazione ospite può influenzare la probabilità di evidenziazione di positività nel corso delle attività di sorveglianza in due modi: migliorando l'efficienza di

trasmissione del virus aumenta la proporzione di individui infetti nella popolazione, quindi la probabilità di rilevare una positività tra gli uccelli campionati; se come è plausibile la prevalenza virale nei soggetti giovani è maggiore rispetto agli adulti, aumentando la proporzione di giovani nella popolazione aumenta la probabilità di prelevare un soggetto positivo.

Anche variazioni del periodo di eliminazione virale inducono modificazioni significative nella probabilità di evidenziazione precoce del virus nei soggetti campionati, poiché condiziona la finestra di tempo utile alla rilevazione della circolazione virale ed incide sulla dinamica della trasmissione virale, quindi sull'andamento del contingente di volatili infetti, e di conseguenza sulla probabilità di rilevazione di positività con l'attività di sorveglianza.

Lo sforzo di cattura e lo sforzo di caccia incidono senza dubbio sull'efficacia delle attività di monitoraggio, condizionando direttamente la numerosità di individui messi a disposizione per il campionamento, ma considerando che solo una parte dei soggetti abbattuti o catturati vengono esaminati, che la quota dei soggetti campionati non cresce proporzionalmente con quella di abbattimento e cattura, poiché condizionata da limiti logistici e finanziari, e che una modifica, ad esempio, del tasso di cattura dal 25% al 35% può richiedere uno sforzo in termini di risorse dedicate molto grande, per ottenere una variazione proporzionalmente piccola della probabilità di rilevamento del virus (dallo 0,0023 al 0,0026), non si può pensare di incrementare l'efficacia della sorveglianza attiva aumentando il tasso di prelievo venatorio o di cattura di animali vivi.

Il modello matematico di infezione da virus HPAI H5N1 presenta un andamento dell'infezione tipico degli agenti eziologici caratterizzati da elevata letalità e basso coefficiente di trasmissione, incapaci di persistere nella popolazione ospite e che mostrano quindi un picco della prevalenza seguito da una rapida estinzione dell'infezione. La prevalenza virale del periodo considerato è risultata pari allo 0,17%, valore molto più basso di quello utilizzato nell'elaborazione statistica sui

tassi di rilevamento dell'infezione i cui risultati sono stati già esposti, ma che rientra nel range osservato in Europa durante il piano di monitoraggio per l'anno 2006, che riporta prevalenze comprese tra lo 0,01% della Gran Bretagna e il 7,38% della Slovenia (nello stesso anno la prevalenza virale in Italia è stata dello 0,94%) (SANCO, 2007). Analizzando la situazione epidemiologica relativa agli ultimi anni in Europa, la relativamente breve durata dei focolai negli uccelli selvatici e il frequentemente basso numero di uccelli infetti ritrae un quadro differente da quello osservato in paesi extra-europei, ad esempio in Cina, dove si è osservata una consistente mortalità a carico di diverse specie selvatiche. La mortalità nell'epidemia da H5N1 HPAI nel 2006 in UE è stata relativamente bassa, perfino in aree con alte densità di uccelli. Assumendo che la maggior parte degli uccelli sono recettivi all'infezione, il proporzionalmente basso numero di infezioni e la bassa mortalità anche in aree ad alta densità di uccelli suggeriscono che il tasso di trasmissione, malgrado la trasmissione fosse molto probabilmente favorita dalle basse temperature e dall'aumentata densità degli uccelli in alcune aree, si sia mantenuto abbastanza basso. Il tasso di trasmissione è influenzato principalmente dalla disponibilità e dalla densità di ospiti recettivi, dalla sopravvivenza del virus, dalla concentrazione nell'ambiente e dalla durata dell'escrezione virale. D'altro canto, se la sorveglianza passiva è iniziata a seguito del verificarsi di episodi di mortalità su larga scala, si può ipotizzare che molti focolai di H5N1 HPAI negli uccelli selvatici non siano stati segnalati, specialmente se avvenuti in aree a bassa densità di uccelli (Hesterberg *et al.*, 2009).

L'andamento dei focolai nel corso del 2006, inoltre, suggerisce che H5N1 HPAI non si mantenga efficacemente nelle popolazioni selvatiche in Europa. In alternativa, il virus potrebbe persistere a prevalenze molto basse nelle popolazioni di uccelli selvatici in UE e non essere evidenziato. Malgrado l'ultima ipotesi sia verosimile, i focolai di H5N1 HPAI negli uccelli selvatici in UE nel 2007 hanno visto coinvolti ceppi di H5N1 HPAI che, benché strettamente correlati, sono differenti e chiaramente distinguibili da quelli presenti nel 2006: sono quindi,

verosimilmente, risultato di nuove introduzioni. Analisi genetiche dettagliate dei virus isolati dal 2006 portano alla conclusione che nel 2006 ci siano state diverse introduzioni indipendenti prima che si verificasse la diffusione locale dell'infezione fra gli uccelli selvatici. Di conseguenza, questi rilievi suggeriscono che il virus H5N1 HPAI non persista e non circoli nelle popolazioni selvatiche per lunghi periodi di tempo in assenza di focolai nel pollame domestico (Hesterberg *et al.*, 2009).

Le probabilità di evidenziazione di positività per H5N1 attraverso piani di monitoraggio risultano in generale molto basse, proprio perché il modello restituisce una dinamica dell'infezione caratterizzata da livelli di trasmissione insufficienti a garantire il mantenimento del virus nella popolazione ospite, quindi da lunghi intervalli temporali in cui la prevalenza è pari o vicina allo zero. Più in specifico, le probabilità di rilevamento della circolazione virale attraverso attività di sorveglianza attiva sono praticamente nulle, poiché l'intervallo temporale nel quale è virtualmente possibile campionare un soggetto positivo è estremamente ridotto, e la quota di positivi sul totale dei campionati è comunque irrisoria. Il campionamento degli individui malati o morti attraverso la sorveglianza passiva si conferma così l'unico metodo potenzialmente efficace nell'evidenziazione precoce della circolazione virale, con una probabilità di successo circa 1.000 volte superiore rispetto alle due metodiche di campionamento di soggetti apparentemente sani messe insieme. Questo risultato riprende in termini relativi quello ottenuto con lo studio sui tassi di rilevamento dell'infezione, ribadendo la maggiore efficacia delle attività di sorveglianza passiva rispetto a quelle di sorveglianza attiva, ma nello stesso tempo ridimensiona tale efficacia dal punto di vista del tempo e dello sforzo campionario necessari alla rilevazione precoce della circolazione virale. Questo poiché alla staticità del calcolo applicato nella prima fase dello studio statistico il modello contrappone una elaborazione dinamica, che tiene conto delle modifiche nel tempo del numero di individui recettivi ed infetti e dell'andamento tipicamente

epidemico della prevalenza virale. L'importanza della sorveglianza passiva emersa in entrambi i metodi statistici utilizzati è confermata dai dati ricavati dal monitoraggio della circolazione del virus H5N1 su scala europea, che riportano per il 2006 una percentuale degli isolamenti riconducibile ad animali rinvenuti morti o malati pari al 97,5%.

Analizzando anche i risultati del calcolo della sensibilità della variabile *PROB* alle variazioni di alcuni parametri inseriti nel modello si nota come il parametro indubbiamente più importante nell'influenzare la probabilità di rilevamento della circolazione virale nella popolazione indagata è il tasso di letalità. Se per variazioni del tasso di letalità comprese tra il 50% e il 40% la variabile *PROB* rimane assestata su valori vicini a 0,001 (che si traduce in una probabilità di rintracciare il virus su 1.000 volatili testati), con un tasso di letalità pari al 30% la probabilità di evidenziazione di positività si riduce di 5 volte, e si avvicina a valori prossimi allo zero per tassi di letalità inferiori al 20%.

Le chiavi di volta per determinare la riuscita o il fallimento dell'attività di sorveglianza per il rilevamento precoce dell'infezione da virus HPAI H5N1 si rivelano così due: il fattore tempo, che condiziona la finestra utile al rilevamento dal momento dell'introduzione del virus in una meta-popolazione recettiva, ed il fattore mortalità che, seppur per un periodo breve, rende disponibili una quota di soggetti positivi che muoiono a seguito dell'infezione e costituiscono una proporzione elevata (quasi il 70%) del totale degli uccelli trovati morti.

Risulta evidente come un'attenta valutazione del valore da attribuire al tasso di letalità e delle conseguenze della variabilità di questo parametro sui risultati della sorveglianza siano indispensabili a definire le scelte strategiche migliori per una pronta identificazione dell'introduzione del virus in popolazioni selvatiche.

Se per un tasso di letalità pari al 50% (metà degli individui infetti muoiono entro 4 giorni dal contatto con il virus) il tempo utile per attuare il campionamento ed avere una probabilità di individuare il virus tra i soggetti campionati è limitato ad una ventina di giorni (vedi figura 33 nel Capitolo precedente), variazioni del tasso di

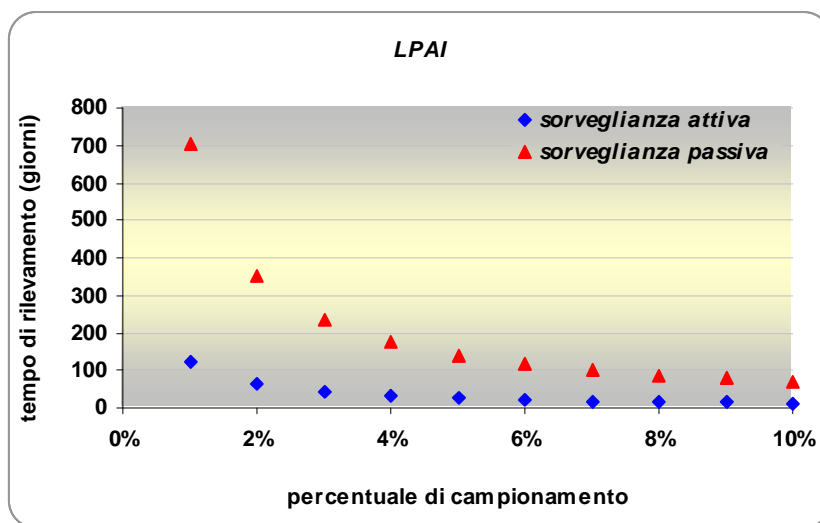
letalità hanno ripercussioni non tanto sul valore della prevalenza virale, quanto sul profilo della curva epidemica descritta dall'infezione, e sulla possibilità di persistenza dell'infezione. Da un punto di vista gestionale, se da un lato all'aumento del tasso di letalità corrisponde un'estinzione dell'infezione in tempi più rapidi, riducendosi l'intervallo temporale utile alla sorveglianza, dall'altro aumenta il numero di individui morti o malati disponibili per il campionamento, e fonte certa di isolamento virale. Purtroppo le informazioni sulla virulenza da virus H5N1 in specie selvatiche sono scarse, limitate a studi sperimentali ed il tasso di letalità reale associato ad un'infezione di campo è influenzato da molte variabili, quali l'eterogeneità dei patotipi coinvolti e la parziale copertura immunitaria che può dar luogo a infezioni subcliniche o a tassi di letalità ridotti (Sturm-Ramirez *et al.*, 2005). Poiché l'obiettivo finale è la valutazione di una soglia di rilevamento della presenza dell'infezione, che permetta di valutare in quali condizioni sia effettivamente possibile attivare un sistema di allerta rapido a seguito dell'introduzione del virus in popolazioni selvatiche e prevenirne la diffusione (al pollame domestico, ad altre specie animali, ad altre popolazioni selvatiche), si rivela utile definire diversi quadri epidemiologici caratterizzati da una diversa efficacia delle misure di sorveglianza. Interrogando il modello riguardo l'andamento del numero di animali morti a seguito dell'infezione per diversi tassi di letalità in popolazioni di diverse dimensioni, e sovrapponendo a questo dato l'indicazione della FAO riguardante il numero minimo di uccelli rinvenuti morti nella stasse località che hanno alte probabilità di rilevazione dell'infezione da virus HPAI H5N1, si conclude che nelle popolazioni piccole, al di sotto dei 1.000 individui, la rilevazione dell'introduzione del virus risulta improbabile, anche con tassi di letalità elevati (50%). Con tassi di letalità più bassi (10%, 30%) muore a seguito dell'infezione un numero utile all'attivazione delle misure di allerta solo in meta-popolazioni numerose (10.000, 20.000 individui). Questa constatazione porta a ipotizzare che nelle sub-popolazioni più piccole il virus HPAI H5N1 potrebbe essere introdotto, infettare un numero basso di animali, causare la morte di pochi individui ed estinguersi, o essere veicolato da uno

o più volatili su distanze più o meno lunghe, senza alcuna possibilità di rilevazione da parte delle attività di monitoraggio. Ancora, non ci sarebbero possibilità di rilevazione dell'introduzione del virus nel caso esso presentasse una virulenza nei confronti delle specie selvatiche minore rispetto a quella attesa, provocando bassi o nulli livelli di mortalità e rendendo inefficaci le misure di sorveglianza passiva.

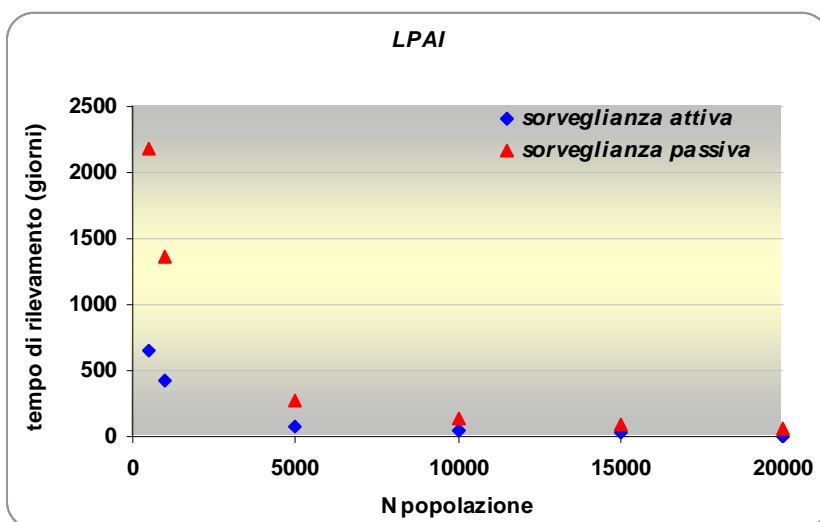
Considerando che lo scopo ultimo dell'analisi è quello di definire i tempi e le modalità con i quali l'attivazione di misure di sorveglianza si rivela efficace alla rapida rilevazione del virus H5 nelle popolazioni di volatili selvatici, dal modello di simulazione sono stati ricavati e messi in relazione il tempo di rilevazione di almeno un soggetto infetto e valori variabili della percentuale di campionamento (per meta-popolazioni di 10.000 individui) e della dimensione della meta-popolazione oggetto del campionamento (per una percentuale di campionamento pari al 2%). Nel caso di infezioni da virus LPAI il tempo di rilevamento attraverso la raccolta e l'esame di volatili trovati morti (sorveglianza passiva) viene fortemente influenzato dalla percentuale di campionamento (campionando solo un 10% del totale degli animali morti, la tempistica per rilevare un positivo si dilata fino a oltre 700 giorni), mentre le variazioni subite dal tempo necessario ad una prima diagnosi per mezzo di attività di sorveglianza attiva al variare della percentuale di campionamento sono minori (figura 39a). Malgrado questo, i tempi di rilevazione, con percentuali di campionamento realistiche, risultano lunghi: campionando dall'1% al 3% del totale dei volatili abbattuti e catturati il tempo di rilevazione varia dai 40 ai 125 giorni, si abbassa sotto i 20 giorni con percentuali di campionamento superiori al 6%, che però si traducono in una dimensione del campione da sorveglianza attiva maggiore di 9.000 volatili all'anno.

La dimensione della popolazione da campionare influenza significativamente il tempo di rilevamento dell'infezione LPAI nel caso di comunità inferiori ai 1.000 individui (il tempo per rilevare un positivo è superiore ai 400 giorni), mentre con le attività di sorveglianza attiva in sub-popolazioni costituite da più di 10.000

permettono di rilevare il virus entro 36 giorni (figura 39b).



a

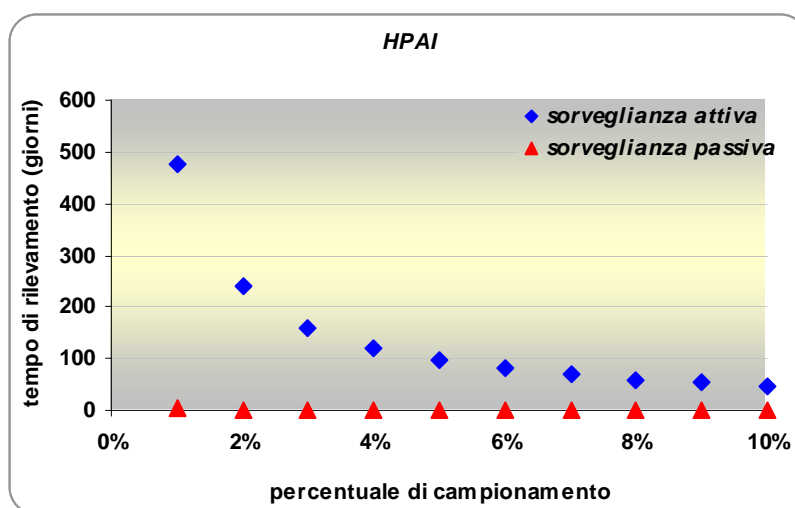


b

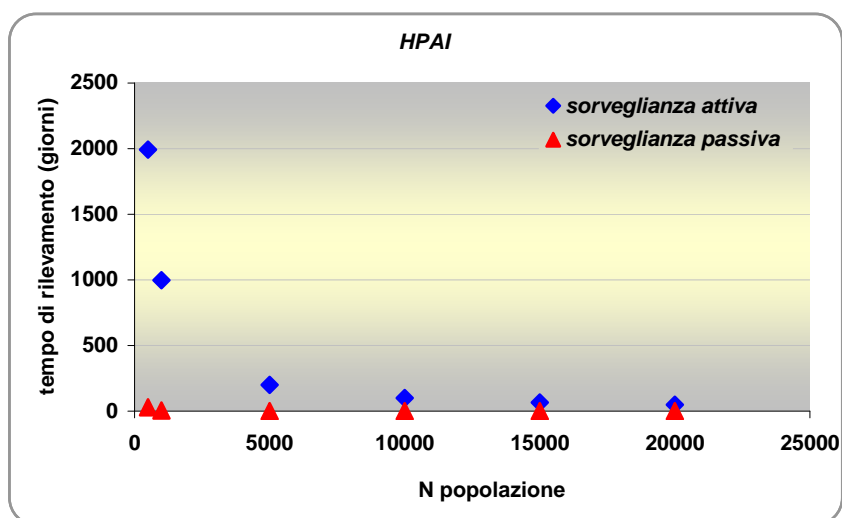
Fig. 39 - Effetto di variabili percentuali di campionamento (a) e numerosità della popolazione (b) sul tempo minimo di rilevamento della circolazione di virus LPAI.

Nell'infezione da virus HPAI H5N1, il dato più importante che la simulazione

restituisce è quello per cui le variazioni nella percentuale di soggetti campionati e nella dimensione della sub-popolazione oggetto del campionamento non influiscono significativamente sulla tempistica di evidenziazione di positività attraverso la sorveglianza passiva (figure 40a e 40b). La raccolta dei volatili rinvenuti morti o malati si conferma il mezzo più efficace per la rilevazione precoce della circolazione di virus ad alta patogenicità, entro un intervallo compreso tra uno e tre giorni per percentuali di campionamento variabili tra 1% e 10%, e con tempistiche inferiori ai 5 giorni per sub-popolazioni costituite da più di 1.000 individui, ed inferiore al mese di campionamento per sub-popolazioni di dimensioni minori.



a



b

Fig. 40 - Effetto di variabili percentuali di campionamento (a) e numerosità della popolazione (b) sul tempo minimo di rilevamento della circolazione di virus HPAI.

5.4 QUALE SORVEGLIANZA PER L'INFUENZA AVIARE NELL'AVIFAUNA SELVATICA?

La raccolta di dati di migliore qualità, e la notifica dei risultati positivi e negativi della sorveglianza dell'influenza aviaria (AI) si rivelano cruciali per comprendere i parametri dell'infezione, le possibili vie di trasmissione, e il potenziale impatto sulle popolazioni di uccelli migratori (Butler, 2006). Queste informazioni possono essere utilizzate per concentrare gli sforzi nel corso di un'emergenza epidemica, per prevedere l'evoluzione futura dell'infezione, e per orientare scelte politiche efficaci per ridurre l'impatto economico e il rischio per la conservazione delle popolazioni selvatiche rappresentati dall'influenza aviare.

L'analisi dei risultati delle attività di sorveglianza in Italia e nel mondo rende evidente come quasi tutti gli uccelli positivi a H5N1 HPAI siano stati trovati morti o malati, quindi rilevati attraverso misure di sorveglianza passiva, ma anche che non vi è alcuna possibilità di indagare in maniera appropriata l'ecologia del rapporto tra virus e specie ospiti, e quindi di identificare le specie serbatoio, se non attraverso una intensa sorveglianza attiva su animali vivi, mirata a specie ad alto rischio e coinvolgendo un numero di campioni elevato.

Se per l'infezione da virus LPAI le conoscenze riguardo l'epidemiologia ed i rapporti ecologici tra virus e specie selvatiche hanno identificato il serbatoio epidemiologico del virus negli uccelli acquatici migratori, le informazioni raccolte nel corso dei focolai da virus H5N1 HPAI necessitano di ulteriori analisi per migliorare le conoscenze dei fattori che ne influenzano l'epidemiologia negli uccelli selvatici.

Proprio per la carenza di informazioni riguardo l'epidemiologia del virus HPAI H5N1 nelle popolazioni di volatili selvatici e la conseguente difficoltà nel definire strategie mirate all'identificazione della circolazione virale in specie o aree particolarmente a rischio, un sistema di sorveglianza efficace dovrebbe prevedere una combinazione di sorveglianza attiva e passiva (Guberti e Newman, 2007).

Questo fornirà il miglior approccio possibile per una rilevazione precoce di HPAI H5N1 e per verificare la presenza del virus in aree potenzialmente endemiche.

Queste osservazioni, supportate dai risultati ottenuti dall'elaborazione statistica sviluppata nel presente progetto, portano a delineare una serie di azioni utili a migliorare le conoscenze sull'epidemiologia della malattia, quindi ad aumentare l'efficienza del sistema di sorveglianza attuato:

- Implementazione dei programmi di osservazione e monitoraggio negli habitat chiave per l'avifauna selvatica per rafforzare il monitoraggio quotidiano o settimanale dei soggetti morti e facilitare la raccolta e l'analisi di carcasse fresche. Questa forma di monitoraggio richiede personale con una formazione minima, un meccanismo di raccolta e di archiviazione dei dati ed il coordinamento con i servizi veterinari per usufruire di un supporto diagnostico. Questo livello di sorveglianza può essere eseguito con relativa facilità in qualsiasi circostanza. Una formazione ulteriore del personale coinvolto nei programmi di monitoraggio può fornire l'opportunità di registrare informazioni aggiuntive quali la presenza e l'assenza delle diverse specie nell'arco dell'anno, il numero di individui, dati ecologici e comportamentali, la variabilità delle condizioni ambientali, e la presenza di altre malattie nelle popolazioni osservate. Se le risorse finanziarie sono limitate, gli sforzi dovrebbero essere concentrati sui soggetti malati o morti, per aumentare la probabilità di trovare l'HPAI H5N1 in habitat selezionati dove coesistono fattori di rischio aggiuntivi.
- Basandosi sulle conoscenze sulla situazione epidemiologica internazionale di HPAI H5N1, si dovrebbe approntare un'attenta analisi dei dati di morbilità e mortalità nelle popolazioni selvatiche nelle zone considerate a rischio. Le aree ecologicamente collegate a recenti focolai influenzali nel pollame, a casi singoli di mortalità in specie ad alto rischio (principalmente Anseriformi e Caradriformi) dovrebbero essere sottoposte a monitoraggio. Se i fondi a disposizione sono limitati, si potrà limitare le indagini diagnostiche alla ricerca del solo virus

HPAI H5N1. Infine, per avere un quadro completo dell'ecologia del virus HPAI H5N1 nelle aree endemiche o sede di focolai è necessario includere nel monitoraggio le specie "ponte", come colombi, storni, passeri, rondini, per indagare la potenziale trasmissione tra la realtà agro-zootecnica e le zone umide. E' auspicabile lo sviluppo di una rete di comunicazione efficace per riportare i dati epidemiologici collegati ad una potenziale diffusione del virus.

- Se è disponibile personale esperto nella cattura e nella manipolazione di uccelli, la sorveglianza dovrebbe essere condotta su uccelli sani e vivi, utilizzando i principi sottolineati nella precedente sezione, che prevedono: una prevalenza virale minore dell'1%; tamponi tracheali (o tamponi oro-faringei nelle specie più piccole) uniti a tamponi cloacali raccolti su tutti gli individui; la raccolta di campioni deve avvenire nelle stagioni nelle quali la probabilità di trovare il virus è maggiore; se è necessario campionare uccelli acquatici, il monitoraggio deve focalizzarsi sulle zone umide che contengono più di 1.200-1.500 individui (da Guberti et al., 2007); se possibile, è utile campionare gli habitat adiacenti agli allevamenti avicoli, o le specie che transitano negli allevamenti.

Campionamento su animali trovati morti o feriti

Il campionamento degli uccelli malati o morti si è rivelato il metodo più efficace per la rilevazione rapida della presenza del virus H5N1. Finora, gli isolamenti del virus H5N1 sono stati effettuati quasi esclusivamente in uccelli selvatici morti, nonostante il campionamento di molte decine di migliaia di uccelli selvatici sani in Europa, Asia, Nord America e Africa. La debolezza di questo approccio è che, per definizione, la sorveglianza passiva non è utile ad individuare i portatori asintomatici della malattia. Sebbene gli eventi abbiano dimostrato che una vasta gamma di specie di uccelli selvatici possono essere colpiti da virus H5N1, le attività di sorveglianza dovrebbero concentrarsi sulle specie di acquatici poiché sono il gruppo maggiormente colpiti nei focolai di H5N1 di uccelli selvatici in Cina, Mongolia, Azerbaijan e la Germania (Liu *et al.* 2005, Chen *et al.* 2005). Zone con

elevate densità di uccelli acquatici dovrebbero essere monitorate regolarmente per rinvenire le carcasse di uccelli morti. L'intensità del monitoraggio dovrebbe essere aumentata durante i periodi migratori in siti lungo le rotte migratorie. Anche se non vengono trovati uccelli morti, è comunque importante registrare la posizione, la consistenza degli uccelli di ciascuna specie, l'eventuale presenza di animali inanellati, in modo da poter quantificare lo sforzo di monitoraggio profuso ed accrescere le conoscenze riguardo i movimenti migratori e la distribuzione delle specie selvatiche. Inoltre può essere utile coinvolgere in questa forma di monitoraggio associazioni ornitologiche, escursionisti, studenti volontari, con una educazione mirata ai comportamenti da seguire nel caso del rinvenimento. Questo è particolarmente importante nel caso in cui, come si è verificato in Europa nelle recenti epidemie, nei focolai sono stati coinvolti un basso numero di uccelli in zone ad elevata densità.

Nell'attesa che ulteriori indagini possano svelare l'esistenza di specie serbatoio e che sia di conseguenza implementata una sorveglianza mirata verso queste specie, si mantenere e supportare adeguatamente una sorveglianza passiva su larga scala è di grande importanza per l'identificazione precoce di introduzione di H5N1 HPAI. Un'implementazione della sorveglianza passiva può consistere in un'intensificazione delle attività quali sopralluoghi regolari negli habitat frequentati dagli uccelli selvatici migratori, ma anche in un aumento dello sforzo di informazione al pubblico. Mantenere viva l'attenzione dell'opinione pubblica incoraggiando la condivisione delle informazioni, come fornire motivazione e supporto al personale coinvolto, risulta di fondamentale importanza.

Campionamento su animali sani catturati

Il campionamento su animali sani si rivela utile a valutare la circolazione virale a basse prevalenze e ad identificare i ceppi circolanti (sia ad alta e che a bassa patogenicità). Questa forma di monitoraggio degli uccelli sani può servire ad identificare ceppi del virus H5N1 che non danno sintomi né mortalità, e le specie

selvatiche che possono esserne serbatoio. Tuttavia, questo metodo non può imporsi come un mezzo efficace a causa delle grandi dimensioni del campione necessario per essere sicuri di un risultato negativo. Finora, solo due studi hanno dimostrato la presenza di H5N1 in volatili selvatici sani (Kou *et al.* 2005, Chen *et al.*, 2006).

Il campionamento dovrebbe riguardare sia le specie migratorie e sia quelle stanziali, poiché i movimenti di dispersione delle specie considerate 'sedentarie' possono contribuire alla diffusione della malattia entro una certa distanza, come è accaduto nel corso del focolaio tra i cigni reali (*Cygnus olor*) in Europa. Tali movimenti di dispersione sono meno prevedibili di quelli migratori veri e propri e possono essere influenzati da condizioni climatiche estreme, come dal freddo intenso o da periodi di siccità, o di altri importanti cambiamenti nella qualità dell'habitat (Scott e Rose, 1996).

Per investigare l'epidemiologia di H5N1 HPAI negli uccelli selvatici è inoltre importante intensificare la sorveglianza nelle aree dove sono stati raccolti gli animali infetti. Indagini di campo integrate (che includano la raccolta di dati e informazioni sulle specie e sulle popolazioni presenti) nelle aree dove l'infezione è stata identificata può rivelarsi molto utile a questo scopo (Guberti e Newman, 2007). Tale sorveglianza mirata in risposta al verificarsi di un focolaio negli uccelli selvatici può rivelarsi utile a chiarire il ruolo epidemiologico di alcune specie (ad esempio ricordiamo il ruolo dei cigni nell'epidemia del 2006), oltre ad indagare il ruolo di possibile ponte biologico di alcune specie in modo da poter elaborare efficaci misure di biosicurezza utilizzabili dagli allevamenti di pollame (come raccomandato da EFSA e richiesto dalla legislazione europea 2005/734/EC).

Alcune specie, quali svassi, marangoni ed anatre di profondità, benché campionati in piccoli numeri, si sono dimostrate più frequentemente infette rispetto ad altre specie, evidenza attribuibile a diversi fattori, quali recettività, tipo di esposizione e caratteristiche comportamentali (Guberti e Newman, 2007).

Anche gli uccelli rapaci possono considerarsi una fonte di sorveglianza utile

all'identificazione di AI per il contatto con molte specie di uccelli morti potenzialmente infetti sui quali si nutrono. Inoltre, i rapaci diurni (*Falconiformes*) e notturni (*Strigiformes*) hanno mostrato una percentuale di positività a H5N1 HPAI proporzionalmente alta, così che risulta auspicabile la loro inclusione in futuri piani di monitoraggio quale mezzo di sorveglianza.

Al contrario, le anatre, mentre sembra giochino un ruolo importante nell'identificazione di LPAI, sembra abbiano meno valore nella sorveglianza per l'infezione da H5N1 HPAI, come un basso numero di virus influenzali sono stati rinvenuti nei Passeriformes, nei piccioni e nei colombi, attribuendo a queste specie poca importanza nella sorveglianza.

La cattura degli uccelli è un'attività costosa e richiede tempi lunghi, e tali limitazioni sono particolarmente gravose nei Paesi in cui scarseggiano le risorse finanziarie e l'esperienza. In questo senso risulta fondamentale il supporto e la consulenza di organizzazioni internazionali come *Birdlife International*, *Wetlands International* o il *Wildfowl and Wetlands Trust*.

Poiché la prevalenza virale nelle popolazioni selvatiche può essere molto bassa, dovrebbero essere oggetto di campionamento un numero molto elevato di individui per escludere la presenza di H5N1. I recenti focolai nell'Isola di Rügen, Germania, hanno coinvolto un'area con una densità di uccelli acquatici molto elevata. Degli oltre 4.000 uccelli trovati morti, il 3% è risultato positivo per H5N1. Gli oltre 10.000 volatili sani testati nelle zone vicine a Rügen Island sono risultati negativi, suggerendo la trasmissione della malattia con tassi di infezione molto bassi.

Poiché non si conosce una prevalenza di infezione attesa, l'intensità di campionamento dovrebbe conservativamente essere mirata alla rilevazione di almeno un individuo positivo assumendo una prevalenza molto bassa (i.e. 0,5%). Questo presupposto richiede spesso un campione di grandi dimensioni.

Campionamento degli uccelli apparentemente sani abbattuti

I cacciatori possono contribuire alle attività di vigilanza prelevando campioni dagli

uccelli abbattuti. Questo approccio presenta diversi limiti, tra i quali la constatazione che la salute dei volatili prima dell'abbattimento non può essere valutata, la mancata possibilità di ripetere le analisi sullo stesso soggetto, e non di minore importanza il forte disturbo che lo sparo arreca alle popolazioni, e che potrebbe causare spostamenti improvvisi e imprevedibili di volatili infetti e la diffusione dell'infezione (Madsen e Fox, 1995). A causa di queste e di altre debolezze connaturate a questo tipo di campionamento, i governi non dovrebbero utilizzare questo metodo come l'unico mezzo di campionamento e non dovrebbe sostenere un aumento della quota di prelievo di uccelli acquatici con l'attività venatoria per incrementare la sorveglianza dell'influenza aviaria.

I cacciatori dovrebbero essere addestrati al fine di garantire una certa uniformità nelle metodiche di raccolta e di registrazione di informazioni e campioni.

Chiaramente tutte le considerazioni appena esposte si riferiscono allo stato attuale delle conoscenze sull'infezione da virus HPAI H5N1 nei volatili selvatici, ancora scarse e incomplete. L'efficacia del campionamento può essere significativamente incrementata nel caso esista e sia identificato un serbatoio selvatico del virus HPAI H5N1, e quando il coordinamento globale e lo scambio di informazioni possano indirizzare il monitoraggio verso certe macro-aree e specie sulla base della distribuzione spaziale e della situazione epidemiologica del virus HPAI H5N1.

Tali informazioni sono in grado di migliorare la sorveglianza a livello locale, specialmente nella selezione delle specie a rischio, nella definizione di corrette dimensioni campionarie, e nell'individuazione della stagione adatta. Le attuali strategie di sorveglianza per HPAI H5N1 che coinvolgono molte località, ciascuna con una ridotta intensità di campionamento, possono non rilevare uccelli infetti perché la prevalenza di infezione è molto bassa, e gli individui campionati possono non appartenere alla stessa popolazione.

Solo una sorveglianza regolare e ripetuta di habitat adatti avrà la sensibilità sufficiente a verificare episodi di mortalità e darà la possibilità di prelevare soggetti

moribondi e carcasse fresche dove è maggiore la probabilità di isolare HPAI H5N1. Altri programmi attualmente in corso, quali il monitoraggio degli uccelli spiaggiati, nei centri di recupero, o associati all'attività di inanellamento, possono senza dubbio procurare campioni senza costi aggiuntivi, a patto che le specie campionate siano appropriate per la ricerca di HPAI H5N1. Queste forme di sorveglianza passiva sono opportunistiche e sfruttano programmi di monitoraggio preesistenti.

I programmi di campionamento attivo mirato sviluppati da Comunità Europea, FAO, CWS, USGS, USFWS e GAINS sono possibili solo grazie a un significativo impegno finanziario. Malgrado questo, nessun programma di sorveglianza attiva può garantire una rilevazione precoce della circolazione di HPAI H5N1 se l'infezione negli uccelli selvatici è sporadica e la prevalenza molto bassa. I programmi di sorveglianza sono in grado di identificare la malattia solamente quando l'infezione è presente a livelli rilevabili, ed anche in questo caso, il successo del piano dipende da una combinazione di fattori, quali i parametri epidemiologici del virus, la dimensione della popolazione, e l'intensità del campionamento.

La conferma dell'esistenza di un serbatoio selvatico, e la possibilità di identificare fattori in grado di favorire la diffusione del virus influenzale, come le modificazioni ambientali di origine antropica, la conduzione zootecnica intensiva, o la pressione selettiva che rende dominanti ceppi virali adattati a sopravvivere in ambienti modificati (Morse, 1993; Schragg e Wiener, 1995), si rivelano passi fondamentali nel controllo e nella gestione dell'emergenza rappresentata dal virus HPAI H5N1. Le condizioni ambientali, agro-zootecniche ed ecologiche inoltre influenzano i tassi di infezione della malattia, la probabilità di trasmissione, e di mantenimento e persistenza del virus. Una volta che i fattori di rischio vengono identificati con certezza, corrette decisioni gestionali, includendo quelle specifiche per aumentare la biosicurezza, possono minimizzare la diffusione della malattia nelle popolazioni animali domestiche, selvatiche e nell'uomo.

PARTE VI
CONCLUSIONI

CONCLUSIONI

In una definizione generica, la sorveglianza include la raccolta sistematica di dati riferiti ad una malattia in una popolazione, l'elaborazione di questi dati, e la diffusione delle informazioni ottenute a chiunque ne abbia bisogno. La definizione classica comprende due approcci e se applicata specificatamente all'infezione da virus dell'influenza aviaria, comprende una sorveglianza passiva (che consiste nel campionamento opportunistico da varie fonti, specialmente in relazione agli eventi di morbilità e mortalità) ed una sorveglianza attiva (cioè un campionamento mirato all'evidenziazione della specifica malattia o agente eziologico). Il campionamento passivo presenta il vantaggio di poter sfruttare programmi pre-esistenti di monitoraggio o fonti diverse per reperire campioni da uccelli selvatici, quali centri di recupero, giardini zoologici, piani di monitoraggio dei soggetti spiaggiati. I campioni così raccolti non derivano da un numero pre-determinato di individui, né da particolari specie o gruppi di specie. Al contrario, i programmi di sorveglianza attiva garantiscono un certo livello di definizione e un pre-determinato livello di accuratezza. Inoltre, se si è dimostrato che l'evidenziazione della presenza di virus HPAI H5N1 sia possibile solamente attraverso un'intensificazione delle misure di sorveglianza passiva, non vi è alcuna possibilità di identificare le specie serbatoio se non attraverso una intensa sorveglianza attiva su animali vivi, mirata a specie ad alto rischio e coinvolgendo un numero di campioni elevato.

Una riflessione va quindi dedicata alla valutazione di quando, in generale, sia conveniente applicare una forma di sorveglianza rispetto ad un'altra. La sorveglianza passiva risulta più efficiente di quella attiva in qualsiasi caso in cui l'infezione sia associata a sintomi clinici evidenti e/o ad un tasso di letalità elevato, oltre ad un alto livello di allerta di allevatori, operatori sul campo, servizi veterinari. La sorveglianza attiva invece è indispensabile per monitorare infezioni asintomatiche, che non causano mortalità, e nel caso in cui il livello generale di allerta sia basso, ed è quindi da preferire per la sorveglianza di infezioni endemiche,

croniche, ed in particolare per valutare non solo se una malattia è presente, ma anche con quali caratteristiche circola all'interno della popolazione ospite (stima non solo qualitativa, ma anche quantitativa). La sorveglianza attiva non può sostituire quella passiva, se non impiegando risorse umane e finanziarie enormi per la raccolta di campioni di grandi dimensioni.

Da queste considerazioni, emerge come una forma di sorveglianza non possa rimpiazzare l'altra, ma una combinazione efficace di sorveglianza attiva e passiva si imponga come strategia vincente soprattutto nel caso di infezioni caratterizzate da un'epidemiologia complessa come quella da virus influenzali nelle popolazioni di volatili selvatici.

Considerando che informazioni rilevanti sono tuttora insufficienti alla definizione di programmi di sorveglianza per HPAI H5N1, e che esistono effettivi limiti logistici e di finanziamento, un approccio che faccia ricorso a strumenti statistici di valutazione e previsione dell'efficacia delle attività di monitoraggio intraprese si rivela di primaria importanza per indirizzare il processo decisionale ed utilizzare al meglio le risorse disponibili.

L'analisi effettuata, che ha incluso diversi livelli di elaborazione dei dati ed una fase di simulazione dei diversi scenari epidemiologici attraverso l'utilizzo di modelli matematici, ha tentato di fornire criteri oggettivi per la valutazione dei sistemi di sorveglianza tuttora in essere in Italia ed Europa, e di giungere a conclusioni sul possibile sviluppo di un sistema di sorveglianza efficace per la rilevazione precoce della circolazione del virus nelle popolazioni selvatiche.

In prospettiva, il metodo di lavoro utilizzato, con opportune modifiche e possibilità di sviluppo, ad esempio attraverso l'inserimento nell'elaborazione di variabili spaziali, può essere esteso allo studio dei sistemi di monitoraggio di altre infezioni della fauna selvatica, supportando con una tecnica statisticamente validata le scelte strategiche operate nella fase di pianificazione e coordinamento delle attività di sorveglianza a livello nazionale ed internazionale.

PARTE VII
APPENDICE

APPENDICE I

Elenco delle specie di volatili selvatici a più alto rischio di introduzione del virus H5N1 nella Comunità europea.

<i>Nome comune</i>	<i>Nome scientifico</i>
Cigno minore	<i>Cygnus columbianus</i>
Cigno selvatico	<i>Cygnus cygnus</i>
Cigno reale	<i>Cygnus olor</i>
Oca zamperosee	<i>Anser brachyrhynchus</i>
Oca granaiola	<i>Anser fabalis</i>
Oca lombardella	<i>Anser albifrons albifrons</i>
Oca lombardella minore	<i>Anser erythropus</i>
Oca selvatica	<i>Anser anser</i>
Oca facciabianca	<i>Branta leucopsis</i>
Oca colombaccio	<i>Branta bernicla</i>
Oca collarosso	<i>Branta ruficollis</i>
Oca canadese	<i>Branta canadensis</i>
Fischione	<i>Anas Penelope</i>
Alzavola	<i>Anas crecca</i>
Germano reale	<i>Anas platyrhynchos</i>
Codone	<i>Anas acuta</i>
Marzaiola	<i>Anas querquedula</i>
Mestolone	<i>Anas clipeata</i>
Anatra marmorizzata	<i>Marmaronetta angustirostris</i>
Fistione turco	<i>Netta rufina</i>
Moriglione	<i>Aythya ferina</i>
Moretta	<i>Aythya fuligula</i>
Pavoncella	<i>Vanellus vanellus</i>
Piviere dorato	<i>Pluvialis apricaria</i>
Pittima reale	<i>Limosa limosa</i>
Combattente	<i>Philomachus pugnax</i>
Gabbiano comune	<i>Larus ridibundus</i>
Gavina	<i>Larus canus</i>

Elenco dei volatili che vivono in prossimità del pollame domestico

<i>Nome comune</i>	<i>Nome scientifico</i>	<i>Probabilità di contatto con il pollame</i>
Gruppo 1: specie strettamente collegate alla produzione di pollame in Europa		
Oca domestica	<i>Anser anser domesticus</i>	Elevata
Germano reale dom.	<i>Anas platyrhynchos</i>	Elevata
Anatra muta dom.	<i>Cairina moschata</i>	Elevata
Piccione selvatico	<i>Colomba livia</i>	Elevata
Passero domestico	<i>Passer domesticus</i>	Elevata
Gruppo 2: specie che nel nord Europa possono condividere con il pollame domestico gli stessi terreni di allevamento		
Piviere dorato	<i>Pluvialis apricaria</i>	Bassa
Pavoncella	<i>Vanellus vanellus</i>	Media
Gabbiano comune	<i>Larus ridibundus</i>	Elevata
Gavina	<i>Larus canus</i>	Elevata
Gabbiano reale	<i>Larus argentatus</i>	Bassa
Colombaccio	<i>Colomba palumbus</i>	Elevata
Tortora dal collare orientale	<i>Streptopelia decaocto</i>	Elevata
Fagiano	<i>Phasianus colchicus</i>	Elevata
Alaudidi	<i>Alauda & Galerida spp.</i>	Bassa
Calandro		Bassa
Cutrettola		Media
Cesena	<i>Turdus pilaris</i>	Media
Tordo sassello	<i>Turdus iliacus</i>	Media
Gazza	<i>Pica pica</i>	Elevata
Taccola	<i>Corvus monedula</i>	Elevata
Corvo comune	<i>Corvus frugilegus</i>	Media
Cornacchia	<i>Corvus corone</i>	Media
Corvo imperiale	<i>Corvus corax</i>	Bassa
Storno	<i>Sturnus vulgaris</i>	Elevata

Storno nero	<i>Sturnus unicolor</i>	Elevata
Passero domestico	<i>Passer domesticus</i>	Elevata
Passero mattugia	<i>Passer montanus</i>	Elevata
Fringillidi		Media
Emberizidi	<i>Miliaria, Emberiza</i> spp.	Media
Gruppo 3: specie che nel nord Europa possono condividere con gli uccelli acquatici domestici le stesse zone umide		
Egretta	<i>Egretta</i> spp	Bassa
Airone	<i>Ardea</i> e altre spp.	Media
Cormorano	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Media
Cicogna	<i>Ciconia</i> spp.	Bassa
Cigno reale	<i>Cygnus olor</i>	Media
Oca selvatica	<i>Anser anser</i>	Media
Oca canadese	<i>Branta canadensis</i>	Bassa
Anatra	<i>Anas & Aythya</i> spp.	Bassa
Germano reale	<i>Anas platyrhynchos</i>	Elevata
Folaga	<i>Fulica atra</i>	Media
Gallinella d'acqua	<i>Gallinula chloropus</i>	Media

APPENDICE II

Campionamento per influenza aviare nei Paesi Europei nel corso del 2007 con dettaglio sulla percentuale di campioni provenienti da specie ad alto rischio (HRS), sorveglianza attiva, passiva o sconosciuta (Fonte: <http://www.eurosurveillance.org>)

<i>Stato membro</i>	<i>Numero uccelli campionati</i>	<i>HRS campionate</i>	<i>sorveglianza attiva</i>	<i>sorveglianza passiva</i>	<i>sorveglianza di tipo sconosciuto</i>
AT	542	50,6%	38,9%	60,1%	0,9%
BE	2879	67,4%	97,5%	2,5%	0,0%
BG	268	21,6%	64,6%	33,2%	2,2%
CY	272	4,4%	32,0%	54,4%	13,6%
CZ	404	84,2%	1,0%	99,0%	0,0%
DE	23949	54,5%	68,8%	30,1%	1,1%
DK	4844	70,1%	94,8%	5,2%	0,0%
EE	86	66,3%	68,6%	31,4%	0,0%
EL	951	23,6%	53,1%	46,9%	0,0%
ES	8199	26,6%	69,9%	27,9%	2,2%
FI	283	51,9%	81,3%	18,7%	0,0%
FR	2081	79,9%	55,7%	44,3%	0,0%
HU	693	58,4%	77,3%	22,7%	0,0%
IE	421	77,9%	61,5%	38,5%	0,0%
IT	7160	61,1%	88,4%	11,6%	0,0%
LT	715	92,6%	88,0%	12,0%	0,0%
LU	330	14,5%	79,7%	20,3%	0,0%
LV	534	93,6%	95,5%	2,4%	2,1%
MT	32	87,5%	93,8%	6,3%	0,0%
NL	8446	61,2%	92,5%	7,5%	0,0%
PL	592	41,7%	66,2%	18,4%	15,4%
PT	1219	18,0%	66,8%	33,2%	0,0%
RO	828	12,9%	89,0%	10,9%	0,1%
SO	5044	64,1%	93,2%	6,8%	0,1%
SI	334	65,3%	68,9%	31,1%	0,0%

SK	192	33,3%	57,3%	42,7%	0,0%
UK	8094	79,6%	75,9%	24,1%	0,0%
EU	79392	57,2%	77,5%	21,7%	0,8%

PARTE VIII
BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ❖ Acheson R.M., Hall D.J. & L. Aird Eds. (1976). Health information, planning and monitoring. Seminars in community medicine. Volume 2. Oxford University Press, Oxford.
- ❖ Alexander D.J, Allan W.H.& D.G Parson (1978). The pathogenicity of four avian influenza viruses for fowls, turkeys and ducks. *Research in Veterinary Science* 24(2): 242-247.
- ❖ Alexander D.J. (2000). A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology* 74: 3-13.
- ❖ Alexander D.J. & I. Capua (2004). Avian Influenza: recent developments. *SVJ*, Vol. 14, N° 1 2004 : 3-8.
- ❖ Altman D.G., Machin D., Bryant T.N. & M.J. Gardner Eds. (2000). *Statistics with Confidence*. 2nd ed. BMJ Books, London.
- ❖ Amonsin A., Payungporn S., Theamboonlers A., Thanawongnuwech R., Suradhat S., Pariyothorn N., Tantilertcharoen R, Damrongwantanapokin S., Buranathai C., Chaisingh A., Songserm T. & Y. Poovorawan (2006). Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. *Virology* 344: 480–491.
- ❖ Anderson R.M. & R.M. May (1978). Regulation and stability of host-parasite population interactions: I. Regulatory processes. *Journal of Animal Ecology* 47 (1): 219–247.
- ❖ Anderson R.M. & R.M. May (1991). *Infectious diseases of humans* Oxford University Press, Oxford.
- ❖ Anderson R.M. & R.M. May (1992). *Infectious Diseases of Humans: Transmission and Control*, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford.
- ❖ Ayling R.D., Bashiruddin S.E. & F.W. Nicholas Eds. (2000). Mycoplasma species and related organisms found from ruminants in Britain between 1990 and 2000. *Veterinary Record*, 155: 413-416.

- ❖ Baccetti N., Dall'Antonia P., Magagnoli P., Melega L., Serra L., Soldatini C. & M. Zenatello (2002). *Biologia e conservazione della fauna. Risultati dei censimenti degli uccelli selvatici svernanti in Italia: distribuzione, stima e trend delle popolazioni nel 1991-2000.* INFS. Volume 111.
- ❖ Bano S., Naeem K. & S.A. Malik (2003). Evaluation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype H9N2 in chicken. *Avian Disease* 47(Suppl): 817-822.
- ❖ Barlow N.D. (1996). The ecology of wildlife disease control: simple model revisited. *Journal of Applied Ecology* 33: 303-314.
- ❖ Bateson P. (1983). Optimal outbreeding. In: *Mate Choice*.ed. P.Bateson. Cambridge University Press, Cambridge.
- ❖ Becker W.B. (1966). The isolation and classification of Tern virus: influenza A-Tern South Africa. 1961. *Journal of Hygiene*, 64 (3): 309-320.
- ❖ Berthold P. (1993). *Bird migration: a general survey.* Oxford University Press.
- ❖ Beveridge W.I. (1965). Some topical comments on influenza in horses. *Veterinary Record* 77:42.
- ❖ Beveridge W.I., 1978. Where did the red flu come from? *New Scientist* 23: 790-791.
- ❖ Bibby C.J. & S. Lambton Eds. (2000). *Bird Census Techniques.* Elsevier Science & Technology Books, Oxford.
- ❖ BirdLife International (2004). *Birds in Europe: population estimates, trends and conservation status.* BirdLife International Series No 12. BirdLife International, Wageningen, The Netherlands.
- ❖ BirdLife International (2006). *Wild birds H5N1 outbreaks.* BirdLife International, Wageningen, The Netherlands.
- ❖ Blood D.C. & V.P. Studdert (2002). *Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary*, 2nd ed. W.B. Saunders, London.
- ❖ Brown I.H., Hill M.L., Harris P.A., Alexander D.J. & J.W. McCauley (1997). Genetic characterisation of an influenza A virus of unusual subtype (H1N7)

isolated from pigs in England. *Archiv of Virology* 142: 1045-1050.

- ❖ Brown C.S., Horstick O., Naville F., Rodier G. & B. Ganter (2005). Avian influenza outbreaks in the WHO European region and public health actions. *Euro Surveillance* 10(43) <http://www.eurosurveillance.org>
- ❖ Cameron A.R. & F.C. Baldock (1998). A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease. *Preventive Veterinary Medicine*, 34: 1-17.
- ❖ Cannon R.M. & R.T. Roe (1982). *Livestock Disease Surveys: A Field Manual for Veterinarians*. Australian Government Publishing Service, Canberra.
- ❖ Chen H., Smith G.J., Zhang S.Y., Qin K., Wang J., Li K.S., Webster R. G., Peiris J.S.M. & Y. Guan (2005). H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* 436: 191.
- ❖ Chen H., Smith G.J., Li K.S., Fan X.H., Rayner J.M., Vijaykrishna D., Zhang J.X., Zhang J.L., Guo C.T., Cheung C.L., Xu K.M., Duan L., Huang K., Quin K., Leung Y.H., Wu W.L., Lu H.R, Chen Y, Xia N.S., Naipospos T.S., Yuen K.Y., Hassan S.S., Bahri S., Nguyen T.D., Webster R.G., Peiris J.S. & Y. Guan (2006). Establishment of multiple sublineage of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. *Proceedings of the Natural Academy of Science USA*.
- ❖ Cohen J. (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2nd ed. Hillsdale N.J., Lawrence Erlbaum.
- ❖ Cramp S. & K.E.L. Simmons (1977). *Handbook of the birds of Europe, the Middle East, and North Africa, vol.1. Ostrich to Ducks*. Oxford University Press, London.
- ❖ De Jong M.C.M. (1995). How does transmission of infection depend on population size?. In: *Epidemic Models: their structure and relation to data*. Mollison D. Ed., Cambridge University Press, Cambridge.
- ❖ De Jong J. C., Claas E.C., Osterhaus A. D., Webster R. G., & W. L. Lim (1997). A pandemic warning? *Nature* 389: 554.
- ❖ De Marco M.A., Foni E., Campitelli L., Raffini E., Di Trani L., Delogu M.,

- Guberti V., Barigazzi G. & I. Donatelli (2001). Circulation of influenza viruses in wild waterfowl wintering in Italy during the 1993-99 period: evidence of virus shedding and seroconversion in wild ducks. *Avian diseases* 47(Suppl 3): 861-866.
- ❖ De Marco M.A., Foni E., Campitelli L., Raffini E., Delogu M. & I. Donatelli (2003). Long-term monitoring for avian influenza viruses in wild bird species in Italy. *Veterinary Research Communications* 27(Suppl.1): 107-114.
 - ❖ De Marco M.A., Campitelli L., Foni E., Raffini E., Barigazzi G., Delogu M., Guberti V., Di Trani L., Tollis M. & I. Donatelli (2004). Influenza surveillance in birds in Italian wetlands (1992-1998): is there a host restricted circulation of influenza viruses in sympatric ducks and coots? *Veterinary Microbiology* 98(3-4): 197-208.
 - ❖ De Marco M.A., Foni E., Campitelli L., Delogu M., Raffini E., Chiapponi C., Barigazzi G., Cordioli P., Di Trani L. & I. Donatelli (2005). Influenza virus circulation in wild aquatic birds in Italy during H5N2 and H7N1 poultry epidemic periods (1988 to 2000). *Avian Pathology* 34(6): 480 - 485.
 - ❖ Delogu M., De Marco M.A., Donatelli I., Campitelli L. & E. Catelli (2003). Ecological aspects of influenza A virus circulation in wild birds of Western Palearctic. *Veterinary Research Communications* 27(S1): 101-106.
 - ❖ Delogu M., De Marco M.A., Donatelli I. & L. Campitelli (2008). How influenza A virus ecology is evolving in wild birds. In: Allegra E.P Ed., ed. *Avian influenza research progress*. Hauppauge: Nova Biomedical.
 - ❖ Dobson, A.P. & P.J. Hudson (1995). Microparasites: observed patterns in wildlife. In: *Infectious diseases in natural populations*. B. T. Grenfell & A. P. Dobson Eds. Cambridge University Press, Cambridge.
 - ❖ Doherr M. G. & L. Audige (2001). Monitoring and surveillance for rare health-related events: a review from the veterinary perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 356: 1097–1106.
 - ❖ Drake J.W. (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses.

Proceedings of the Natural Academic Science 90: 4171-4175.

- ❖ Earn D.J.D., Dushoff J. & S.A. Levin (2002). Ecology and evolution of the flu. Trends in ecology and evolution 17 (7): 334- 340.
- ❖ EC -SANCO/10268/2006 (2006 May) Guidelines on the implementation of survey programmes for avian influenza in poultry and wild birds to be carried out in the member states in 2007.

http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/eradication/guidelines_SANCO_10268_2006_en.pdf.

- ❖ EC Decision 268/2007/EC (2004 May) Implementation of surveys for avian influenza in poultry and wild birds in the Member States. www.ec.europa.eu.
- ❖ European Food Safety Authority (2005). Animal health and welfare aspects of avian influenza. European Food Safety Authority, Parma, 2005.
- ❖ FAO AIDE NEWS. Update on the avian influenza situation- Issue no. 33.
- ❖ Feller W. (1971). An introduction to probability theory and its application. Volume II. 3rd ed. Wiley, New York.
- ❖ Fouchier R.A., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T.M., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan G.F., Olsen B. & A.D. Osterhaus (2005). Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. Journal of Virology 79(5): 2814-2822.
- ❖ Geraci J.R., St. Aubin D.J., Barker I.K., Webster R.G., Hinshaw V.S., Bean W.J, Ruhnke H.L., Prescott J.H., Early G., Baker A.S. , Madoff S. & R.T. Schooley (1982). Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus. Science 215: 1129-1131.
- ❖ Globig A., Staubach C., Beer M., Köppen U. & W. Fiedler (2009). Epidemiological and ornithological aspects of outbreaks of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 of Asian lineage in wild birds in Germany, 2006 and 2007. Transboundary and Emerging Diseases 56: 57–72.
- ❖ Greenwood P.J. (1980). Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. Animal Behaviours, 28: 1140-1162.

- ❖ Grenfell B.T. & R.M. Anderson (1985). The estimation of age-related rates of infection from case notification and serology data. *Journal of Hygiene* 95: 419-436.
- ❖ Grenfell B.T. & A.P. Dobson (1995). *Ecology of Infectious Disease in Natural Populations*. Cambridge University Press, Cambridge.
- ❖ Gu W. & R.J. Novak (2004). Detection probability of Arbovirus infection in mosquito population. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* 71(5): 636-638.
- ❖ Gu W. & R.K. Swihart (2004). Absent or undetected? Effects of sampling errors on wildlife-habitat models. *Conservation Biology* 116: 195–203.
- ❖ Guberti V. & S.H. Newman (2007). Guidelines on Wild Bird Surveillance for Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus. *Journal of Wildlife Diseases* 43 (3): S29-S34.
- ❖ Guberti V., Scremin M., Busani L., Bonfanti L. & C. Terregino (2007). A Simulation Model for Low-Pathogenicity Avian Influenza Viruses in Dabbling Ducks in Europe. *Avian Diseases* 51 (s1): 275-278.
- ❖ Gulland F.M.D. (1995). The impact of infectious diseases on wild animal populations – A review. In: *Ecology of Infectious Disease in Natural Populations* Grenfell B.T. & A.P. Dobson (Eds), Cambridge University Press, Cambridge.
- ❖ Gwinner E., 1990. *Bird migration. Physiology and ecophysiology*. Springer-Verlag.
- ❖ Hamilton, W. D. (1982). Pathogens as causes of genetic diversity in their host populations. In: *Population biology of infectious disease agents*. R.M. Andersson & R.M. May (Eds.), Verlag-Chemie, Weinheim. pp. 269-296.
- ❖ Hammack J., Tillman M.F. & G.M. Brown (1976). Mallard population dynamics and management models. *Journal of Wildlife Management* 40(3): 542-555.
- ❖ Hanley J.A. & A. Lippman-Hand (1983). If nothing goes wrong, is everything all right? Interpreting zero numerators. *JAMA* 249: 1743–1745

- ❖ Happold J.R., Brunhart I., Schwermer H. & K.D. Stärk (2008). Surveillance of H5 avian influenza virus in wild birds found dead. *Avian Diseases* 52: 100–105.
- ❖ Harder T.C. & O. Werner (2006). Avian Influenza. *Influenza Report* 2006.
- ❖ Harvey R., Martin A.C., Zambon M. & W.S. Barclay (2004). Restrictions to the adaptation of influenza a virus H5 hemagglutinin to the human host. *Journal of Virology* 78: 502-507.
- ❖ Hayek L.A.C. & M.A. Buzas (1997). *Surveying natural populations.* a University, New York.
- ❖ Health M.F. & M.I. Evans (2000). Important bird areas in Europe: priority sites for conservation. Cambridge UK Birdlife international (Birdlife conservation series No.8) Volume 1:Northern Europe Volume 2:Southern Europe.
- ❖ Heesterbeek J.A.P. & M.G. Roberts (1995). *Mathematical models for microparasites of wildlife.* Cambridge University Press, Cambridge.
- ❖ Hesterberg U., Harris K., Stroud D., Guberti V., Busani L., Pittman M., Piazza V., Cook A. & I. Brown (2009). Avian influenza surveillance in wild birds in the European Union in 2006. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 3(1): 1-14.
- ❖ Hinshaw V.S., Webster R.G & B. Turner (1980). The perpetuation of horthomyxovirus and paramyxovirus in Canadian waterfowl. *Canadian Journal of Microbiology* 26: 622-629.
- ❖ Hinshaw V.S., Bean W.J. , Webster R.G., Rehg J.E., Fiorelli P., Early G., Geraci J.R. & D.J. St. Aubin (1984). Are seals frequently infected with avian influenza viruses? *Journal of Virology* 51: 863-865.
- ❖ Hinshaw V. S., Bean W. J. , Webster R. G., Fiorelli P., Early G. & J.R. Geraci (1986). Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale. *Journal of Virology* 58: 655-656.
- ❖ Hudson P.J., Rizzoli A., Grenfell B.T., Heesterbeek H. & A.P. Dobson Eds. (2002). *The Ecology of Wildlife Diseases.* Oxford University Press, Oxford.
- ❖ Hulse-Post D.J., Sturm-Ramirez K.M., Humberd J., Seiler P., Govorkova E.A., Krauss S., Scholtissek C., Puthavathana P., Buranathai C., Nguyen T.D., Long

- H.T., Naipospos T.S., Chen H., Ellis T.M., Guan Y., Peiris J.S. & R.G. Webster (2005). Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 102(30): 10682-10687.
- ❖ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (2006). Resoconto dell'attività di sorveglianza svolta nell'avifauna selvatica italiana per la ricerca di influenza aviaria svolta nel 2006. <http://www.izsvenezie.it>
 - ❖ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (2007). Resoconto dell'attività di sorveglianza svolta nell'avifauna selvatica italiana per la ricerca di influenza aviaria svolta nel 2007. <http://www.izsvenezie.it>
 - ❖ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (2008). Resoconto dell'attività di sorveglianza svolta nell'avifauna selvatica italiana per la ricerca di influenza aviaria svolta nel 2008. <http://www.izsvenezie.it>
 - ❖ Jeong-Ki K., Negovetich N.J., Forrest H.L. & R.G. Webster (2009). Ducks: The “Trojan Horses” of H5N1 influenza. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 3(4): 121-128.
 - ❖ Johnson N.P. & J. Mueller (2002). Updating the account: global mortality of the 1918-1919 “Spanish” influenza pandemic. *Bulletin of the history of medicine* 76: 105- 115.
 - ❖ Kalchreuter H. (1990). Studies on mortality in waterfowl. *Baltic Birds* 5: 170-181.
 - ❖ Kawaoka Y., Krauss S. & R.G. Webster (1989). Avian to human transmission of the PB1 Gene of influenza A virus in the 1957 and 1968 pandemics. *Virology* 63: 4603-4608.
 - ❖ Keawcharoen J., Oraveerakul K. & T. Kuiken (2004). Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerging Infectious Diseases* 10: 2189-91.
 - ❖ Keeling M.J. & C.A. Gilligan (2000). Bubonic plague: a metapopulation model of a zoonosis. *Proceedings of the Royal Society of London B* 267: 2219-2230.
 - ❖ Kendal A.P., Noble G.R., Skehel J.J. & W.R. Dowdle (1978). Antigenic

similarity of influenza A virus from epidemics in 1977-1978 to Scandinavian strain isolated in epidemics of 1950-1951. *Virology* 89: 632-636.

- ❖ Kilbourne E.D. (1960). The severity of influenza as a reciprocal of host susceptibility. In: Ciba foundation Study Group, No 4. Virus virulence and pathogenicity. Little, Brown and Co, Boston.
- ❖ Kilbourne E.D. (2006). Influenza Pandemics of the 20th century. *Emerging infectious disease* 12: 9-14.
- ❖ Klingenberg B., Englund L., Rott R., Junnti N. & G. Rockborn (1985). An avian influenza A virus killing a mammalian species- the mink. *Archiv of Virology* 86: 347-351.
- ❖ Kou Z., Lei F.M., Yu J., Fan Z.J., Yin Z.H., Jia C.X., Xiong K.J., Sun Y.H., Zhang X.W., Wu X.M., Gao X.B. & T.X. Li (2005). New genotype of avian influenza H5N1 viruses isolated from tree sparrows in China. *Journal of Virology* 79(24): 15460-15466.
- ❖ Kwon Y.K., Joh S.J., Kim M.C., Sung H.W., Lee Y.J., Choi J.G., Lee E.K. & J.H. Kim (2005). Highly pathogenic avian influenza (H5N1) in the commercial domestic ducks of South Korea. *Avian Pathology* 34: 367-370.
- ❖ Krauss S., Walker D., Pryor S.P., Niles L., Chenghong L., Hinshaw V.S. & R.G. Webster (2004). Influenza A viruses of migrating wild aquatic birds in North America. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 4(3): 177-189.
- ❖ Lee Ligon B. (2005). PhD. Avian influenza virus H5N1: A Review of its History and Information regarding its potential to cause the next pandemic. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 16: 326-335.
- ❖ Levy P.S. & S. Lemeshow (1999). *Sampling of Populations: Methods and Applications*. 3rd ed., John Wiley, New York.
- ❖ Li K.S., Guan Y., Wang J., Smith G.J., Xu K.M., Duan L., Rahardjo A.P., Puthavathana P., Buranathai C., Nguyen T.D., Estoepangestie A.T., Chaisingh A., Auewarakul P., Long H.T., Hanh N.T., Webby R.J., Poon L.L., Chen H., Shortridge K.F., Yuen K.Y., Webster R.G. & J.S. Peiris (2004). Genesis of a

highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 430(6996): 209-213.

- ❖ Liu J., Xiao H., Lei F., Zhu Q., Quin K., Zhang X.W., Zhang X.L., Zhao D., Wang G., Feng Y., Ma J., Liu W., Wang J. & G.F. Gao (2005). Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science* 309 (5738): 1206.
- ❖ Lohr S. (1999). *Sampling: design and analysis*. Brooks/Cole, Pacific Grove, California.
- ❖ Madsen J. & A.D. Fox (1995). Impacts of hunting disturbance on waterbirds – a review. *Wildlife Biology* 1: 193-207.
- ❖ Magnino S., Fabbi M., Moreno A., Sala G., Lavazza A., Ghelfi E., Gandolfi L., Pirovano G. & E. Gasperi (2000). Avian influenza virus (H7 serotype) in a saker falcon in Italy. *Veterinary Record* 146 (25): 740.
- ❖ Martin V., von Dobschuetz S., Lemenach A., Rass N., Schoustra W. & L. DeSimone (2007). Early warning, database, and information systems for avian influenza surveillance. *Journal of Wildlife Diseases* 43 (3): S71-S76.
- ❖ McCallum H., Barlow N. & J. Hone (2001). How should pathogen transmission be modelled? *Trends in Ecology and Evolution* 16(6): 295-300.
- ❖ Meah M.N. & G.A. Lewis (2000). *Veterinary Surveillance in England and Wales – A review*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Publications, London.
- ❖ Mihelson K.A., Mednis A.A. & P.N. Bloom (1982). Demography of nesting population of ducks, *Ornithological studies in the USSR*. Collection of papers, vol.1 USSR Academy of Science, Moscow, Russia, pp. 148-167.
- ❖ Moilanen A. (2002). Implications of empirical data quality to metapopulation model parameter estimation and application. *Oikos* 96: 516–530.
- ❖ Mörner T., Obendorf D.L., Artois M. & M.H. Woodford (2002). Surveillance and monitoring of wildlife diseases. *Revue scientifique et technique OIE* 21 (1): 67-76.

- ❖ Morse S.S (1993). Examining the origins of emerging viruses. In: Emerging viruses, 3rd ed. S.S. Morse (ed.) Oxford University Press, New York. pp. 10-28.
- ❖ Muench H. (1959). Catalytic model in epidemiology. Harvard University Press, New York.
- ❖ Munster V.J., Veen J., Olsen B., Vogel R., Osterhaus A.D. & R.A. Fouchier (2006). Towards improved influenza A virus surveillance in migrating birds. *Vaccine* 24(44-46): 6729-6733.
- ❖ Nusser S.M., Clark W.R., Otis D.L. & L. Huang (2008). Sampling considerations for disease surveillance in wildlife populations. *Journal of Wildlife Management* 72(1): 52-60.
- ❖ O'Brien S.J. & J.F. Evermann (1988). Interactive influence of infections disease and genetic diversity in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution*, 3 (10): 254-259.
- ❖ Office Internationale des Epizooties (2004). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: chapter 2.1.14 Highly Pathogenic Avian Influenza, 5th ed., OIE Paris.
- ❖ Olsen B., Munster V.J., Wallesten A., Waldenstrom J., Osterhaus A.D.M.E. & R. A. M. Fouchier (2006). Global patterns of influenza A virus in wild birds *Science* 21 April vol.312 p.384-388.
- ❖ Organizzazione Mondiale per la Sanità (2007). La timeline: dieci anni di influenza aviaria. Documento OMS.
- ❖ Perkins L.E. & D.E. Swayne (2002a). Susceptibility of laughing gulls to H5N1 and H5N3 highly pathogenic avian influenza virus. *Avian Diseases* 46b (4): 877-885.
- ❖ Perkins L.E. & D.E. Swayne (2002b). Pathogenicity of a Hong Kong origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks and pigeons. *Avian Diseases* 46 (1): 53-63.
- ❖ Perkins L.E. & D.E. Swayne (2003). Varied pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 avian influenza virus in four passerine species and budgerigars.

Avian Diseases 40(1): 14-24.

- ❖ Perroncito C.E. (1878). Epizoozia tifoide nei gallinacci. Torino: Annali Accademia Agricoltura 1878, 21:87-126.
- ❖ Philippa J.D., Munster V.J., Bolhuis H., Bestebroer T.M., Schaftenaar W., Beyer WE, Fouchier R.A., Kuiken T. & A.D. Osterhaus (2005). Highly pathogenic avian influenza (H7N7): vaccination of zoo birds and transmission to non-poultry species. *Vaccine* 23 (50):5743-50.
- ❖ Quirk M. (2004). Zoo tigers succumb to avian influenza. *Lancet Infectious Diseases* 4: 716.
- ❖ Reid A.H., Fanning T.G., Hultin J.V. & J.K. Taubenberger (1999). Origin and evolution of the 1918 “Spanish” influenza virus hemoagglutinin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 1651-1656.
- ❖ Reid A.H., Fanning T.G. & J.K. Taubenberger (2004). Evidence of an absence: genetic origin of the 1918 influenza virus. *Nature Reviews Microbiology* 2: 909-914.
- ❖ Rohwer F.C. & M.G. Anderson (1988). Female biased philopatry, monogamy, and the timing of pair formation in migratory waterfowl. *Current Ornithology* 5: 187-221.
- ❖ Scott D.A. & P.M. Rose (1996). Atlas of Anatidae populations in Africa and Western Eurasia. Wetlands International Publications N° 41, Wetlands International, Wageningen, The Netherlands.
- ❖ Scudamore J.M. (2000). Surveillance – past, present and future. In: Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine Proceedings, Edinburgh, 29-31 marzo 2000. Eds Thrusfield M.V. & Goodall E.A.
- ❖ Schragg S.J. & P. Wiener (1995). Emergent infectious diseases: What are the relative roles of ecology and evolution? *Trends in Ecology and Evolution* 10: 319-324.
- ❖ Serra L., Magnani A., Dall'Antonia P. & N. Baccetti (1997). Risultati dei censimenti invernali degli uccelli acquatici in Italia, 1991-1995. *Biologia in*

Conservazione della Fauna 101: 1-312.

- ❖ Shaffer, T. L. & D.H. Johnson (2008). Ways of learning: observational studies versus experiments. *Journal of Wildlife Management* 72: 4–13.
- ❖ Sharp G.B., Kawaoka Y., Wright S.M., Turner B., Hinshaw W. & R.G. Webster (1993). Wild ducks are the reservoir for only a limited number of influenza A serotypes. *Epidemiology and Infection* 110: 161.
- ❖ Sharp G.B., Kawaoka Y., Jones D.J., Bean W.J., Pryor S.P., Hinshaw V. & R.G. Webster (1997). Coinfection of wild ducks by influenza A viruses: distribution patterns and biological significance. *Journal of Virology* 71: 6128-6135.
- ❖ Sims L.D., Domenech J., Benigno C., Kahn S., Kamata A., Lubroth J., Martin V. & P. Roeder (2005). Origin and evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Asia. *Veterinary Record* 157(6):159-164.
- ❖ Songserm T., Jam-on R., Sae-Heng N. & N. Meemak (2006). Survival and stability of HPAI H5N1 in different environments and susceptibility to disinfectants. *OIE/FAO International Scientific Conference on Avian Influenza. Developmental Biology* 124: 254.
- ❖ Spina C.A. (2003). *Cattle plague: a history*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- ❖ Stallknecht D.E., Shane S.M., Kearney M.T. & P.J. Zwank (1990). Persistence of avian influenza virus in water. *Avian Disease* 34(2): 406-11.
- ❖ Stuart-Harris C. (1979). Epidemiology of influenza in Humans. *British Medical Bulletin* 35: 3-8.
- ❖ Sturm-Ramirez K.M., Ellis T., Bousfield B., Bisset L., Rehg J.E., Poon L., Guan Y., Peiris M. & R.G. Webster (2004). Reemerging H5N1 viruses in Hong Kong 2002 are highly pathogenic to ducks. *Journal of Virology* 78(9): 4892-4901.
- ❖ Sturm-Ramirez K.M., Ellis T., Bousfield B., Bisset L., Dyrting K., Rehg J.E., Poon L., Guan Y., Peiris M. & R.G. Webster (2004). Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *Journal of Virology* 78(9): 4892-4901.

- ❖ Sturm-Ramirez K.M., Hulse-Post D.J., Govorkova E.A., Humberd J., Seiler P., Puthavathana P., Buranathai C., Nguyen T.D., Chaising A., Long H.T., Naipospos T.S., chen H., Ellis T.M., Guan Y., Peiris J.S. & R.G. Webster (2005). Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia? *Virology* 79(17): 11269-11279.
- ❖ Swayne D.E. & D.L. Suarez (2000). Highly pathogenic avian influenza. *Revue scientifique et technique OIE* 19: 463-8.
- ❖ Swaine D.E. & J.R. Beck (2004). Heat inactivation of avian influenza and Newcastle disease virus in egg products. *Avian Pathology* 33: 512-518.
- ❖ Taubenberger J.K. & D.M. Morens (2006). 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerging Infectious Disease* 12: 15-22.
- ❖ Terregino C., Bonfanti L., Guberti V., Cattoli G., De Nardi R., Moreno A., Marzadori F. & I. Capua (2005). Influenza aviaria in Italia: situazione epidemologica. *State Veterinary Journal -Vol 14 N° 1*.
- ❖ Terregino C., Cattoli G., De Nardi R., Beato M.S., Guberti V. & M. Scremin (2005). Isolation of influenza A virus subtype H7N7 and H7N4 from waterfowl in Italy. *Veterinary Records* 156(9): 292.
- ❖ Terregino C., DeNardi R., Guberti V., Scremin M., Raffini E., Moreno-Martin A., Cattoli G., Bonfanti L. & I. Capua (2007). Active surveillance for avian influenza viruses in wild birds and backyard flocks in Northern Italy during 2004 to 2006. *Avian Pathology* 36: 337–344.
- ❖ Thacker S.B. & D. F. Stroup (1998). Public Health Surveillance. In *Applied Epidemiology: Theory to Practice*, ed. R. C. Brownson & D. B. Petitti. Oxford University Press, New York.
- ❖ Thacker S.B. & G.S. Birkhead (2002). Surveillance. In: *Field Epidemiology*, Gregg M.B. ed., 2nd ed. Oxford University Press, New York.
- ❖ Thompson S. K. (2002). *Sampling*. John Wiley and Sons, New York.
- ❖ Thrusfield M.V. (2001). *Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology*. Eds. Noordhuizen J.P.T.M., Frankena K., Thrusfield M.V. &

Graat E.A.M. Wageningen Pers, Wageningen.

- ❖ Thrusfield M. (2005). *Veterinary Epidemiology*. 3th ed. Blackwell Publishing Company, Oxford.
- ❖ Toft C.A., Aeschlimann A. & L. Bolis Eds. (1991). *Parasite-host associations: coexistence or conflict?* Oxford University Press, Oxford.
- ❖ USGS (2004). US Geographical Survey. West Nile virus Maps. <http://westnilemaps.usgs.gov/historical.html>.
- ❖ Vennette R. C., Moon R. D. & W.D. Hutchinson (2002). Strategies and statistics of sampling for rare individuals. *Annual Review of Entomology* 47: 143–174
- ❖ Xu C., Fan W., Wei R. & H. Zhao (2004). Isolation and identification of swine influenza recombinant A/Swine/Shandong/1/2003 (H9N2) virus. *Microbes and Infection* 6: 919-25.
- ❖ Webster R.G., Yakhno M., Hinshaw V.S., Bean W.J. & K.G. Murti (1978). Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84: 268-278.
- ❖ Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M. & Y. Kawaoka (1992). Evolution and ecology of influenza A virus. *Microbiological Review* Mar: 152-179.
- ❖ Webster R.G. & E.J. Walker, 2003. Influenza. *American Scientist* 91 (2), March 2003.
- ❖ Webster R.G., Peiris M., Chen H. & Y. Guan (2006). H5N1 outbreaks an enzootic influenza. *Emerging infectious diseases* 12(1): 3-8.
- ❖ Wetlands International (2002). *Waterbirds Population Estimates*. 3rd ed, Wetland International Global Series N° 12, Wageningen, The Netherlands.
- ❖ WHO Expert Committee (1971). A revised system of nomenclature for influenza viruses. *Bulletin WHO* 45: 119- 124.
- ❖ WHO Expert Committee (1980). A revision of the system of nomenclature for influenza viruses. *WHO memorandum Bulletin* 58: 585- 591.
- ❖ WHO. Avian influenza – Situation in Asia: altered role of domestic ducks. 29

October 2004.

- ❖ WHO. Avian influenza: assessing the pandemic threat. WHO/CDS/2005.29, January 2005.
- ❖ WHO. H5N1 avian influenza: timeline 8 May 2006.
- ❖ Wilking H., Ziller M., Staubach C., Globig A., Harder T.C & F.J. Conraths (2009). Chances and Limitations of Wild Bird Monitoring for the Avian Influenza Virus H5N1 — Detection of Pathogens Highly Mobile in Time and Space. PLoS One 4(8): e6639.
- ❖ Wobeser G.A. (1994). Investigation and management of disease in wild animals. Plenum Press, New York.
- ❖ Wobeser G.A. (1997). Disease of wild waterfowl. Plenum Press, New York.
- ❖ Zitzow L.A., Rowe T., Morken T., Shieh W.J., Zaki S. & J.M. Katz (2002). Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. Journal of Virology 76: 4420-4429.