

REVIEW/RASSEGNA

Il lungo viaggio dell'*Orthomixovirus* *A/goose/Guangdong/2/96(H5N1)*

Seconda Parte

Guglielmo Gargani

Firenze

Key words: avian influenza, H5N1, migrating birds

The long journey of *Orthomixovirus A(H5N1)* (Part II of II)

INTRODUZIONE

La peste aviaria ed i virus dell'influenza

Nel 1878 E. Perroncito¹ descrisse una grave malattia gastro-intestinale dei polli a carattere epidemico, che denominò peste aviaria; nel 1901 Centanni e Savonuzzi, mediante prove di filtrazione, ne dimostrarono l'origine virale. Oltre mezzo secolo più tardi, nel 1955, le migliorate metodiche virologiche misero in stretta relazione questo virus con il tipo A del virus influenzale; ambedue furono classificati qualche anno dopo come *Orthomixovirus*, tipo A. Fra questi virus esistono strette affinità virologiche e percorsi epidemiologici legati fra loro, ma la sintomatologia intestinale della peste aviaria è ben diversa da quella respiratoria dell'uomo e di qualche altro mammifero.

Nel 1931 Shope identificò il virus dell'influenza suina, e poco più di un anno dopo, nell'inverno 1932-33, Smith, Andrewes e Laidlaw, coltivarono, mediante passaggio nel furetto di liquido di lavaggio faringeo di un paziente, l'agente dell'influenza umana, un virus con almeno un antigene² in comune con quello di Shope. Dopo la descrizione rispettivamente nel 1940 e nel 1947 di altri due virus simili da casi di influenza, i due primi furono indicati come "virus A" e gli altri rispettivamente "virus B" e "virus C".

Nell'uomo l'influenza è nota come malattia da raffreddamento nei mesi invernali (dicembre febbraio) da oltre due millenni, e almeno dal XIV secolo (Villani) come forma epidemica, addirittura pandemica, non obbligatoriamente dipendente dalla stagione fredda. I tre virus provocano forme cliniche praticamente identiche (salvo una maggior gravità di quella da virus A nel corso di alcune epidemie), ma ben diverse dal punto di vista epidemiologico. I virus del tipo A colpiscono oltre all'uomo e al maiale, qualche altro mammifero,

gli uccelli domestici, nei quali provocano la malattia descritta dal Perroncito, e gli uccelli palustri. I virus del tipo B, salvo sporadiche segnalazioni, si trovano solo nell'uomo e provocano piccole epidemie, di solito nel tardo inverno o all'inizio della primavera. I virus C hanno finora causato, solo nell'uomo, casi sporadici (Tabella 1).

Gli *Orthomixovirus*

Il genoma degli *Orthomixovirus* è un RNA, ad elica negativa che, legato ad una proteina, forma nel virione il nucleocapside (a simmetria elicoidale) al quale sono associate tre RNA polimerasi RNA dipendenti, che stampano una elica complementare positiva, successivamente tradotta nei ribosomi cellulari in proteine con varie funzioni. Il genoma del virus A si differenzia da quello degli altri *Orthomixovirus*, inclusi quelli B e C dell'influenza, in quanto, a differenza di questi dove è un unico tratto, è formato da 8 segmenti a replicazione indipendente (Tabella 2).

Gli otto segmenti di RNA codificano ciascuno una diversa proteina, con una o più funzioni (Tabella 2). Determinanti per la epidemiologia sono le due glicoproteine (glicosilate da enzimi cellulari) inserite nella membrana pericapsidica. La emoagglutinina (H), così detta in quanto messa in evidenza "in vitro" dalla attività emoagglutinante, determina "in vivo" l'adesione ai recettori della membrana citoplasmatica delle cellule e la conseguente penetrazione nel citoplasma, mentre la neuramidasi (N), così detta per la sua attività enzimatica, prende parte alla liberazione del virioni neoformati, ne impedisce l'aggregazione e ne facilita la diffusione fra le cellule delle mucose. La capacità di aggredire selettivamente le cellule delle diverse specie animali ed anche dei diversi tratti dell'organismo, quello respiratorio nei mammiferi, quello intestinale negli uccel-

¹ 1847-1922. professore alla Scuola Superiore di Veterinaria di Torino

² Detto allora "antigene solubile" poi identificato con quello del nucleocapside

li, è legata alla glicoproteina H. Mentre per i tipi B e C, identificati dall'antigene del nucleocapside, non si conoscono sottotipi ma solo piccole variazioni degli antigeni di superficie (H ed N), per il virus A i sottotipi sono numerosi, e definiti dalla combinazione degli antigeni H (che sono 16) e degli antigeni N (che sono 9).

Le grandi pandemie del XX secolo sono state conseguenza della diffusione di sottotipi nuovi: quella del 1918 fu attribuita al virus H1N1 (isolato solo nel 1933) sulla base di indagini epidemiologiche nella popolazione e su reperti conservati, mentre per quella del 1957, e quella del 1968 l'attribuzione rispettivamente ai sottotipi H2N2 ed H3N2 fu determinata con sicurezza dalla identificazione dei rispettivi stipiti prototipo.

Pochi altri sottotipi di virus A sono stati isolati da alcune specie di mammiferi: cavallo (con un certo impatto economico), foca, balena, visone. Tutti i sottotipi si trovano negli uccelli palustri o marittimi, dai quali alcuni passano agli uccelli domestici provocando la "peste aviaria".

Tipi e sottotipi antigenici, combinati con i dati di isolamento, vengono utilizzati per la denominazione dei virus influenzali, codificata dalla WHO, secondo il tipo (A, B, C), l'ospite se diverso dall'uomo, il luogo di isolamento, un numero progressivo, l'anno di isolamento, l'antigene H, l'antigene N. Il virus che attualmente interessa è chiamato, secondo questi criteri, A/Goose/Guangdong/2/96/(H5N1). Fu infatti isolato da una oca nella regione cinese del Guangdong nel 1996, è del tipo A, con antigeni di superficie H5 ed N1.

Tabella 1. Genere Orthomixovirus: i virus dell'influenza*

Nome virus	Tipo genoma	Epidemiologia umana	Habitat
Virus influenza A	Segmentato	Pandemie ed epidemie annuali	Molte specie di uccelli Uomo cavallo maiale visone foca
Virus influenza B	Non segmentato	Epidemie	Uomo occasionalmente qualche mammifero
Virus influenza C	Non segmentato	Casi sporadici	Uomo

*Altri due virus ad RNA con genoma non segmentato, quello dell'anemia infettiva dei salmoni ed il virus Thagoto sono classificati fra gli Orthomixovirus, ma non hanno relazione epidemiologica con le malattie umane.

Tabella 2. Segmenti di RNA e proteine codificate

Gene HA	Emoagglutinine (16 diverse)
Gene NA	Neuraminidasi (9 diverse)
Gene NP	Nucleoproteina (3 diverse)
Gene M	2 proteine matrici
Gene NS	2 proteine non strutturali
Gene 6	Polimerasi Pa
Gene 7	Polimerasi Pb1
Gene 8	Polimerasi PB2

Influenza: antropozoonosi o zoonosi

Mentre l'influenza da virus B e C è una malattia a contagio interumano, quella da virus A è da porsi fra le antropozoonosi: malattie da agenti infettivi, che circolano abitualmente in animali diversi dall'uomo, ma possono dopo un occasionale passaggio, trasmettersi da uomo ad uomo fino a provocare epidemie e pandemie.

Le grandi pandemie e le epidemie annuali di influenza hanno una storia epidemiologica di contagio interumano, ma 50 anni or sono, ricerche di epidemiologia sierologica e, recentemente, l'analisi molecolare degli stipiti virali hanno dimostrato che sottotipi virali passarono dagli uccelli all'uomo: previa ricombinazione con virus umani già circolanti nel 1957 e nel 1968, attraverso il maiale nel 1918³. In quei momenti storici non esisteva nella popolazione esperienza immunitaria verso gli antigeni (in particolare l'antigene H) di questi sottotipi, che quindi circolarono ampiamente e rapidamente dando origine a pandemie, indipendenti dalla stagione fredda: nel 1918 alla fine dell'estate e nel 1957 e nel 1968 addirittura all'inizio di questa. Negli anni successivi alle varie pandemie, i nuovi sottotipi continuarono a circolare nella popolazione umana, resistendo alle difese immunitarie mediante piccole variazioni antigeniche, e provocarono in coincidenza con la stagione fredda epidemie, talvolta anche di discrete dimensioni, a contagio esclusivamente interumano.

D'altro canto in alcuni contesti epidemiologici l'influenza è una "zoonosi", infezione che circola fra gli animali e solo occasionalmente colpisce l'uomo, ospite terminale, provocando singoli casi

di malattia o piccoli focolai epidemici, senza ulteriori contagi interumani, come quello di congiuntivite in Olanda nel 2003⁴, con peso assai modesto sulla vita dell'umanità. A partire dal 1997, però, si sono verificati episodi di trasmissione all'uomo,

ancora ospite terminale, di rilievo non per l'incidenza, ma per la gravità di evoluzione (letalità intorno al 50%), in vaste aree del Sud Est asiatico e, molto recentemente, del Medio Oriente, fino a un totale di 228 casi di cui 130 ad evoluzione letale (20 giugno 2006)

Situazioni del genere non dovrebbero destare preoccupazione se non in campo locale, ma l'allarme è giustificato dalle precedenti pandemie.

³Le indagini sul virus di questa pandemia sono state fatte su materiale conservato; recentemente l'ipotesi del passaggio attraverso il maiale è stata messa in dubbio: il genoma ricostruito del virus del 1918 sarebbe interamente di origine aviaria.

⁴L'episodio da virus H7N7 fu ad andamento benigno, salvo per un veterinario, probabilmente esposto in modo massiccio nel quale si ebbe patologia respiratoria con evoluzione infausta.

È possibile che dopo l'occasionale passaggio dagli uccelli all'uomo una variante acquisti la capacità di passare da uomo ad uomo così che l'infezione da zoonosi diventerebbe **antropozoonosi**, con le tre fasi: **deposito negli uccelli/passaggio all'uomo/catena infettiva interumana**.

Il Virus Influenza A e gli uccelli

Fra il virus dell'influenza A e gli uccelli di varie specie si individuano due tipi di rapporto. Uccelli acquatici, in gran parte migratori, sono **ospiti naturali**, nei quali l'infezione decorre in modo silente, con prolungata, continua, anche se non massiccia, eliminazione del virus nell'ambiente. Polli, tacchini, oche ed anatre domestiche, struzzi, sono **ospiti aberranti**, infettati occasionalmente, finora solo da alcuni sottotipi antigenici, con conseguente malattia acuta, ad evoluzione spesso letale, alta contagiosità ed abbondante eliminazione del virus nell'ambiente.

Nelle molteplici specie di uccelli acquatici, ed in alcune di uccelli terrestri, sono stati individuati tutti i sottotipi del virus A. La maggiore o minore capacità di aggredire gli uccelli domestici e alcuni mammiferi, incluso l'uomo, è, per l'esperienza attuale, legata agli antigeni H (le emoagglutinine): i sottotipi che provocano epizootie negli uccelli domestici, polli, tacchini, struzzi, anatre ed oche hanno gli antigeni H5, H7, combinati con vari antigeni N (1). In tutti gli uccelli le sedi di riproduzione del virus, con l'eccezione delle anatre domestiche nelle quali è il tratto respiratorio, sono l'intestino e la cloaca. Da qui il virus neofornato viene eliminato elimina con le feci nell'ambiente, dove permane a lungo⁵, con possibilità di trasmissione, nelle aree di pastura, ad altri uccelli selvatici o domestici. Da questi, alcuni stiptipi sono occasionalmente passati a qualche mammifero, uomo, cavallo, maiale, visone, foca, balena e recentemente, nel corso della attuale epizootia in Asia, tigre, leopardo, gatto.

Gli uccelli domestici polli e tacchini, per i quali si verifica il maggior danno economico, presentano due forme cliniche, una lieve, caratterizzata da penne arruffate e ridotta produzione di uova, ed una grave, che si evolve rapidamente verso la morte (letalità fino al 100%). La prima è legata agli stiptipi LPAI (*Low Pathogenic Avian Influenza*), la seconda agli HPAI (*High Pathogenic Avian Influenza*), sia dei sottotipi H5, sia dei sottotipi H7. Fino a non molto tempo fa si riteneva che gli uccelli acquatici albergassero e trasmettessero al pollame solo virus nella forma a bassa virulenza e che fosse il passaggio in serie nel nuovo ospite a provocare la selezione di

varianti virulente, ma recentemente si è constatato che alcune specie acquatiche selvagge infettate dal sottotipo H5N1 vanno incontro a malattia acuta e morte.

Trasmissibilità interspecie

La trasmissibilità, limitata da una "barriera" di classe zoologica, è facile e frequente fra uccelli di varie specie, difficile e rara fra uccelli e mammiferi. Le emoagglutinine virali, che sono la struttura di attacco del virione alle cellule, si legano a glicoproteine o glicolipidi della membrana citoplasmatica riconoscendo il legame glicosidico fra l'acido sialico ed il penultimo residuo "alfa 2-3Gal" negli uccelli, "alfa 2-6Gal" nei mammiferi. La diversa evoluzione clinica dell'infezione fra mammiferi e uccelli, patologia respiratoria nei primi, patologia intestinale nei secondi, è condizionata dalla presenza prevalente dei recettori sull'epitelio bronchiale nei mammiferi, o sull'epitelio cloacale negli uccelli.

Il passaggio dagli uccelli ai mammiferi, non si ha notizia del contrario, presuppone un adattamento del virus aviario alle cellule di questi, conseguente ad un riassetto genetico o per mutazione, o per ricombinazione con altro stiptite virale. Non necessariamente il passaggio dagli uccelli all'uomo avviene attraverso un ospite intermedio, probabilmente il maiale nel 1918, ma è indispensabile che dopo una infezione casuale il virus abbia la capacità di continuare a trasmettersi in una catena interumana per provocare, data l'assenza di pregressa immunità nella popolazione, una pandemia come accadde nel 1918 (spagnola), nel 1957 (asiatica), nel 1968 (cinese).

Il virus A/Goose/Guangdong/2/96(H5N1)

Nel 1961 un virus A con antigeni di superficie H5N1 fu isolato in Sud Africa da un gabbiano, ed è un suo particolare stiptite quello che occupa le cronache degli ultimi mesi. Il suo viaggio comincia nel 1996 quando compare in un allevamento del Guangdong, (Cina Meridionale), dando per la prima volta sintomi di malattia in un'oca domestica. Secondo le regole WHO il virus viene denominato: **A/Goose/Guangdong/2/96(H5N1)**.

Il primo episodio di malattia umana

Non molto tempo dopo, nel maggio del 1997, in un ospedale di Hong Kong dall'aspirato tracheale di un bambino di tre anni, affetto da morbo di Reye, con soprammessa patologia respiratoria, venne isolato un virus A H5N1, con la caratteristica sequenza di amino acidi basici della emoagglutinina degli stiptipi aviari ad alta patogenicità

⁵ Il virus A (H5,N1) può sopravvivere nelle feci di uccello a 4°C almeno 35 giorni,

(HPAI) (5) (21). Da qui l'ipotesi che il caso, sia pure in assenza di richiami epidemiologici, fosse connesso con gli episodi di infezione occorsi fra i polli nella stessa area.

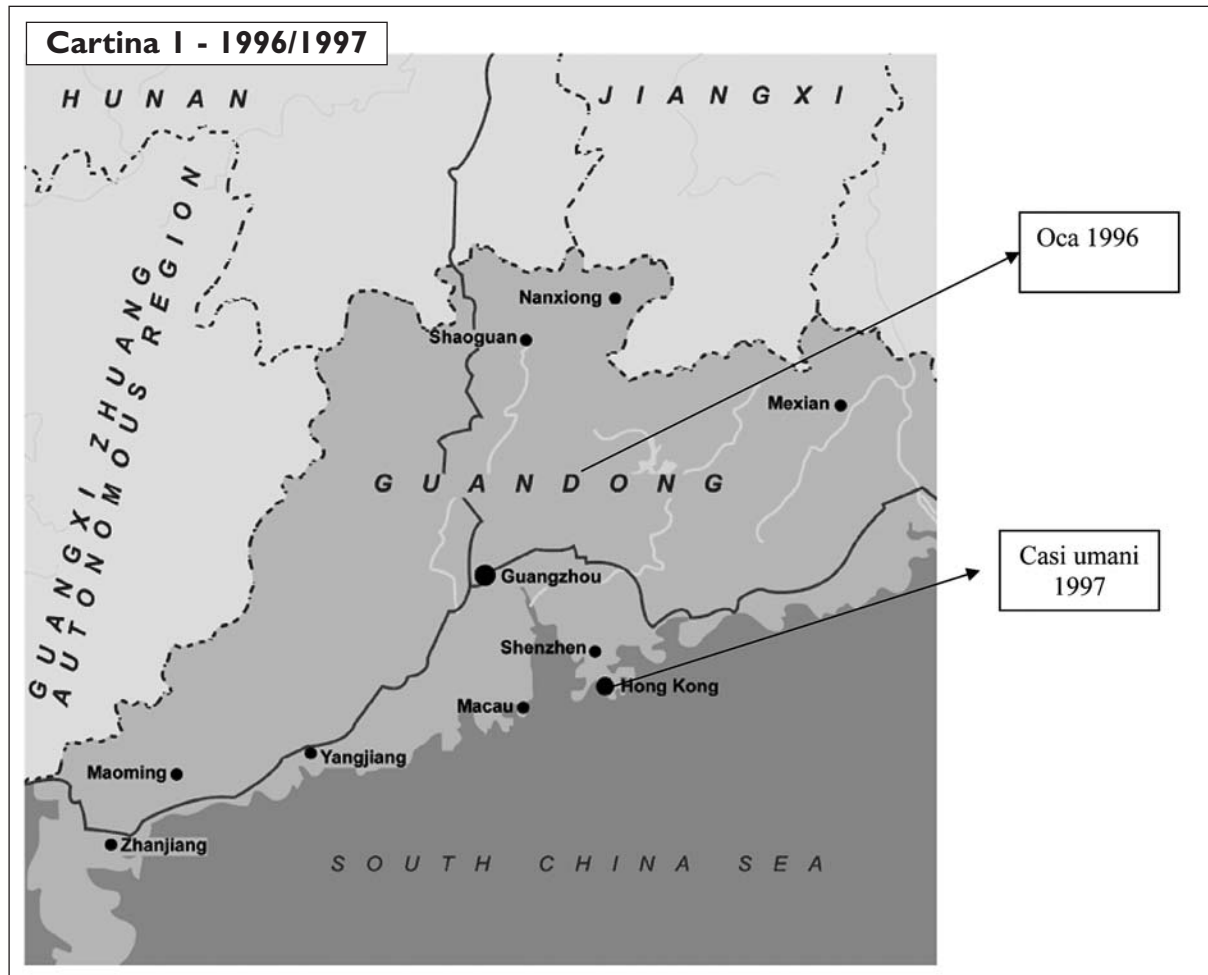
Successivamente, fra la fine dell'estate e l'inizio dell'autunno l'attento controllo della patologia respiratoria umana fece individuare 15 casi, 6 ad evoluzione fatale, di malattia acuta da virus influenzale A (H5N1), non riportabile a contagio interumano, bensì a pregressa frequentazione dei mercati avicoli, dove affluivano uccelli vivi, senza alcuna separazione fra selvaggi e domestici, con grande facilità di contagio, mediato dalle feci, da quelli a questi. Le indagini, su polli ed altri volatili e sulle gabbie, portarono all'isolamento di vari sottotipi, fra i quali A/H5N1 (20% degli isolamenti) ed H9N2 (5%), e l'analisi molecolare dello stipite A/Chicken/Hong Kong/258/97 (H5N1), dimostrò una strettissima relazione genetica con quelli provenienti dai casi umani (19), e con il virus A/Goose/Guangdong/2/96(H5N1) della epizoozia nelle oche del Guangdong (Cartina 1).

Individuata la fonte di contagio, si procedette al

risanamento mediante eliminazione del pollame infetto o sospetto, in tutto oltre un milione di capi, riuscendo a stroncare rapidamente ogni ulteriore apparizione di casi umani.

I casi sporadici del 1999

Due anni più tardi, ancora ad Hong Kong, da due diversi ospedali furono segnalati altrettanti casi di patologia polmonare ad evoluzione benigna, con isolamento del sottotipo A/(H9N2), già individuato nei mercati nel 1997. I due casi non avevano fra loro alcun nesso epidemiologico ed una accurata ricerca su parenti ed operatori sanitari esclude la eventualità di trasmissione interumana (24). Ambedue gli isolati, sperimentalmente patogeni per l'hamster siriano, erano dal punto di vista molecolare affini e probabilmente discendenti per quanto riguarda il gene HA dallo stipite di una quaglia del 1997 (A/quail/HK/G1/97/(H9N2), ma i geni delle proteine non di superficie avevano un notevole grado di omologia con quelli dello stipite responsabile dei casi del 1997, A/Hong Kong/1/1997/(H5N1) (7) 14) (16). Quattro anni più tardi (2003) il medesimo sottotipo virale fu



Cartina 1. Inizio diffusione virus A/Goose/Guangdong 2/96/(H5N1)

coltivato da un bambino, ma l'isolato aveva una diversa provenienza genetica, a testimonianza della rapida variabilità di questi virus (3).

La circolazione del virus negli uccelli fra il 1997 ed il 2003

Il virus A/Goose/Guangdong/2/96(H5N1), nonostante la massiccia eliminazione di uccelli domestici di Hong Kong, continuò a circolare, senza passare all'uomo, nel pollame della Cina meridionale. Nel 2000 infatti isolati Goose/Guangdong/2/96/(H5N1) simili furono coltivati da oche ed anatre importate ad Hong Kong, e se ne individuarono due linee di discendenza genetica, una dalle oche, l'altra, frutto di recente trasmissione, dall'anatra domestica (18) (7). Negli anni immediatamente seguenti (2001-2002) vi furono in Hong Kong vari episodi di malattia dei polli, con isolamento del medesimo virus, limitati da misure quarantenarie, dalla eliminazione di circa 950.000 uccelli e, a partire dal 2002, dalla vaccinazione con vaccino inattivato (19).

Nell'ottobre del 2001 comparvero le prime notizie sulla diffusione del sottotipo H5N1 al di fuori della Cina meridionale. Una indagine trasversale su uccelli vivi, apparentemente sani, nei mercati di Hanoi (Viet Nam), portò all'isolamento di vari sottotipi di virus A. Due, isolati da altrettante oche sane, erano H5N1/HPAI con elevata virulenza sperimentale per i polli, ma scarsa per anatre, topi e furetti (15).

Negli anni immediatamente successivi (2002-2004) l'influenza aviaria si diffuse in almeno nove Paesi del Sud Est Asiatico, producendo notevoli perdite economiche.

A partire dagli ultimi mesi del 2002 ci furono vari episodi ad alta letalità negli uccelli acquatici migratori e in quelli domestici di parchi pubblici, dovuti a vari genotipi della discendenza di A/Goose/Guangdong/2/96/(H5N1). In questi episodi vi sono due elementi epidemiologici nuovi: la tendenza alla escrezione di grandi quantità di virus dalle anatre domestiche, che potrebbero assumere, ed hanno assunto in vari distretti, il ruolo di ultimo anello della catena infettiva prima del passaggio all'uomo e la notevole mortalità fra gli uccelli migratori, che ne modificherebbe, per il ridotto periodo di escrezione, la capacità di diffusione a distanza del virus.

Il ritorno dei casi umani (autunno 2003 - autunno 2004)

La circolazione sempre più ampia del virus fra gli uccelli domestici nei primi anni del nuovo secolo è, per ragioni probabilistiche, premessa della comparsa di casi umani: quanto più numerosi

sono i focolai di malattia nei polli tanto più frequenti sono le occasioni di infezione per l'uomo. Un piccolo episodio epidemico, senza seguito, nell'uomo comparve nel febbraio 2003 in Hong Kong. Si ammalarono un adulto (con evoluzione letale della malattia) ed un bambino (con evoluzione benigna), ambedue componenti di una famiglia di quattro persone, che recentemente aveva fatto un viaggio nella provincia cinese del Fujian, dove un'altra figlia di 8 anni era morta per causa imprecisata. Dai pazienti fu coltivato un virus A/(H5N1), sostanzialmente diverso anche dal punto di vista antigenico, almeno per l'unità emoagglutinante (8), dai precedenti di origine umana e con molte caratteristiche dei virus degli uccelli acquatici (17). L'episodio non è da ritenere in relazione con quello del 1997 e con quelli successivi della fine del 2003 in Thailandia e Viet Nam, ed è forse conseguente ad infezione da uccelli acquatici senza il passaggio per i terrestri. L'indicazione di una possibile maggior capacità del virus ad adattarsi ai mammiferi si ebbe nell'ottobre dello stesso anno quando nello zoo di Suphanburi (Thailandia) morirono, dopo brevissima malattia, due tigri ed un leopardo, nei quali gli esami necroscopici misero in evidenza polmonite, e quelli virologici presenza di virus influenzale A/(H5N1) (9). Le indagini rivelarono che questi animali erano alimentati con carcasse di polli di allevamenti avicoli, dove era elevata la mortalità da influenza aviaria. Più tardi le analisi genetiche su questo isolato e su quello del successivo episodio (fine 2004) ne dimostrarono l'appartenenza alla linea degli stipiti del Viet Nam (2), dove nel frattempo era comparsa la malattia sia nei polli sia nell'uomo.

Alta mortalità in vari allevamenti aviari, attribuibile a stipiti A/(H5N1), era segnalata poco dopo, nel dicembre, dalla Corea e nel gennaio 2004 dal Viet Nam. Qui comparvero casi umani (il primo in dicembre comunicato l'11 gennaio), che raggiunsero, a metà marzo, un totale di 23 con 16 esiti letali, tutti da virus influenza A/(H5N1), e tutti riportabili a contagio da allevamenti famigliari di polli.

Nello stesso mese di gennaio furono segnalati in Thailandia due casi di infezione di laboratorio, altri seguirono, per contagio su campo in relazione ad episodi nei polli, fino ad un totale, a metà marzo, di 12 con 8 esiti fatali. Focolai di malattia nei polli furono segnalati anche in Laos, in Cambogia e in Giappone, ed ai primi di febbraio in Indonesia e in Cina.

Le segnalazioni riprendono dopo un breve intervallo (marzo-maggio): in Viet-Nam a metà giugno malattia nei polli cui seguono a fine luglio casi umani (4, tutti ad esito letale, fra fine luglio e

settembre); in Thailandia, 5 casi umani di cui 4 ad esito letale, mentre in Cina, Indonesia e Malaysia ci sono focolai solo nei polli.

Nella Corea del Sud la malattia compare nelle oche domestiche (13) e da una gazza (*Pica pica sericea*), con epato - splenomegalia e necrosi pancreatica, si coltiva virus H5N1, sperimentalmente virulento per i polli.(12)

A metà ottobre 2004 nel corso di un nuovo episodio nelle tigri di uno zoo in Thailandia si ritenne possibile il passaggio fra tigre e tigre (22), e ci furono rapporti di casi sporadici fra i gatti. Per questa specie, indagini di patologia sperimentale, ne dimostrarono non solo la sensibilità ma anche la trasmissibilità fra gatto e gatto (10). D'altra parte, in questo Paese, indagini epizootologiche rilevarono che la malattia nei polli, e in misura minore nelle anatre, era presente in ben 1476 vilaggi (23)

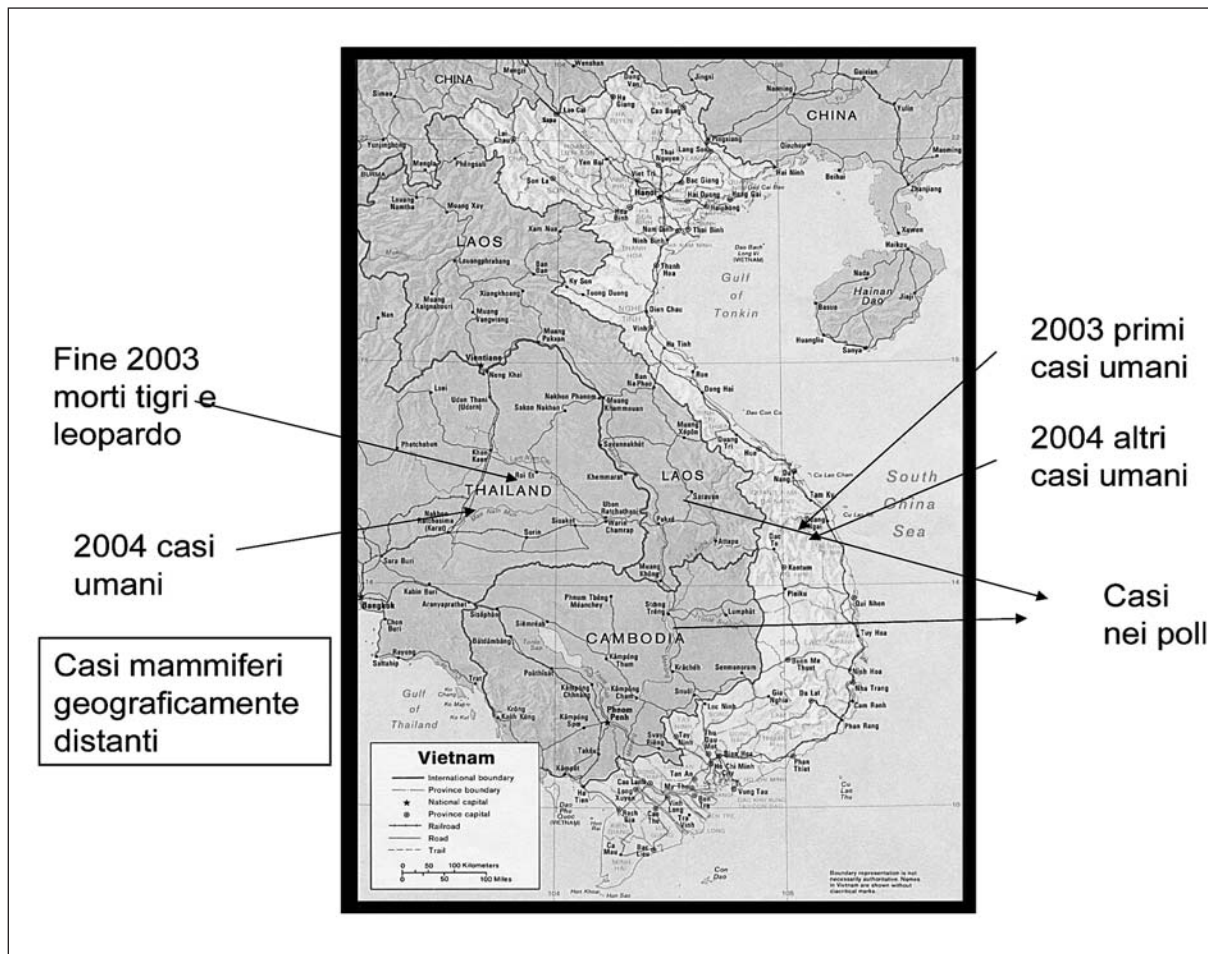
CONCLUSIONI

Fra l'autunno del 2003 e quello del 2004 lo stipte virale A/Goose/Guangdong/2/96/(H5N1), trasportato dagli uccelli migratori, ed in parte anche dal commercio di uccelli vivi, si è diffuso agli

uccelli domestici, polli ed in misura minore oche ed anatre, dalla penisola indocinese a Corea, Cina, Giappone, tuttavia i casi umani fino alla fine del 2004 comparvero in due soli: Paesi VietNam e Thailandia. (Cartina 2)

BIBLIOGRAFIA

1. Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 2000; 74: 3-13.
2. Amonsin A, Payungporn S, Theamboonlers A, et al. Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand *Virology* 2005; Sep 26 (in stampa da Pub.Med.).
3. Butt KM, Smith GJ, Chen H, et al. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5760-67.
4. Cauthen AN, Swayne DE, Schultz-Cherry S, et al. Continued circulation in China of highly pathogenic influenza viruses encoding the hemagglutinin gene associated with the 1997 H5N1 outbreak in poultry and humans *J Virol* 2000; 74: 6592-99.
5. Claas EC, Osterhaus AD, von Beek R, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 1998; 351 (911): 1292.
6. Guan. Y, Peiris M, Kong DF, et al. H5N1 influenza viruses isolated from geese in Southeastern China: evidence for genetic reassortement and interspecies



Cartina 2. Penisola indocinese 2003 - 2004

- transmission to ducks. *Virology* 2002; 292: 16-23.
7. Guan Y, Peiris JS, Poon LL, et al. Reassortants of H5N1 influenza viruses recently isolated from aquatic poultry in Hong Kong SAR *Avian Dis* 2003; 47: 911-13.
 8. Horimoto T, Fukuda N, Iwatsuki-Horimoto K, et al. Antigenic differences between H5N1 human influenza viruses isolated in 1997 and 2003. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 303-05.
 9. Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, et al. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 2189-91.
 10. Kuiken T, Rimmelzwaan G, van Riel D, et al. Avian H5N1 in cats. *Science* 2004; 306: 241.
 11. Kuiken DC, Uyeki TM, Jadhao S, et al. Isolation and characterization of avian influenza viruses, including highly pathogenic H5N1, from poultry in live bird markets in Hanoi Vietnam, in 2001 *J Virol* 2005; 79: 4201-12.
 12. Kwon YK, Joh SJ, Kim MC, et al. Highly pathogenic avian influenza in magpies (*Pica pica sericea*) in South Korea *Wildl Dis* 2005; 41: 618-23.
 13. Kwon YK, Joh SJ, Kim MC, et al. Highly pathogenic avian influenza (H5N1) in the commercial domestic ducks of South Korea. *Avian Pathol* 2005; 34: 367-70.
 14. Lin YP, Shaw M, Gregory V, et al. Avian to human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: Relationship between H9N2 and H5N1 human isolates *Proc Ntl Acad Sc* 2000; 97: 9654-58.
 15. Nguyen DC, Uyeki Tm, Jadhao S, et al. Isolation and characterization of avian influenza viruses, including highly pathogenic H5N1, from poultry in live bird markets in Hanoi, Vietnam. in 2000. *J Virol* 2005; 79: 4201-12.
 16. Saito T, Lim W, Suzuki T, et al. Characterization of human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong *Vaccine* 2001; 20:125-33.
 17. Shinya K, Hatta M, Yamada S, et al. Characterization of a human H5N1 influenza A virus isolated in 2003, *J Virol* 2005; 79: 9926-32.
 18. Sims LD, Domenech J, Benigno C, et al. Origin and evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Asia *Vet Rec* 2005; 157: 159-64.
 19. Sims LD, Ellis TM, Liu KK, et al. Avian influenza in Hong Kong 1997-2002. *Avian Dis* 2003; 47: 832-38.
 20. Sims LD, Guan Y, Ellis TM, et al. An update on avian influenza in Hong Kong 2002. *Avian Dis* 2003; 47: 1083-86.
 21. Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness *Science* 1998, 279: 393-96
 22. Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R, et al. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 699-701.
 23. Tiensin T. Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1, Thailand 2004 *Emerg Infect Dis* 2005
 24. Uyeki YM, Chong YH, Katz JM, et al. Lack of evidence for human-to-human transmission of avian influenza A(H9N2) viruses in Hong-Kong, China 1999 *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 154-59.

Guglielmo Gargani

Via Tommaso Campanella 6, 50136 Firenze

Tel.: 055 666 842

E-mail: guglielmo@gargani.it