Observatoire Madagascar GRIPAVI 2009

Introduction

La maladie de Newcastle et l'Influenza aviaire sont présents à Madagascar. Le contexte agro-écologique ainsi que les pratiques d'élevage et commerciales de cette ile sont favorables à la circulation de ces 2 virus [1-4] : mixité des espèces, présence d'eau et de rizières, présence d'oiseaux sauvages, marchés de volaille vivantes, circuits commerciaux multiples, faible protection sanitaire.

Compte tenu de ce contexte, les questions de recherches abordées par l'observatoire Madagascar sont les suivantes :

- ⇨ Quelle sont les prévalences sérologiques et virologiques de l'IA et de la MN chez les volailles domestiques et l'avifaune sauvage?
- ⇨ Quelles sont les souches de virus IA et de virus MN qui circulent chez la volaille et l'avifaune sauvage à Madagascar?
- ⇨ quels sont les facteurs de risques agro-écologiques de circulation et de maintenance du virus AI à Madagascar ?
- ⇨ quel est le rôle de l'avifaune sauvage (résidents, péri-domestique et migrateurs) dans le cycle de l'Influenza aviaire
- ⇨ Quelles sont les caractéristiques des systèmes villageois et modernes de production avicole à Madagascar ? La diffusion des virus IA et MN se fait-elle via les voies de commercialisation de la volaille ?

En début de projet, et au regard des facteurs de risque présents (mixité, densité animale, rizière etc…), 2 sites d'étude ont été identifiés : le Lac Alaotra et Antananarivo et ses alentours

Principaux résultats acquis en 2008

Description et analyses des filières

Fin 2008, les données des enquêtes visant à établir une typologie des élevages et à construire les diagrammes décrivant les différentes filières (soit 522 élevages et 58 marchés) étaient saisies. Les analyses statistiques ont démarré début 2009.

Sérologie

Fin 2008, les résultats préliminaires de l'enquête sérologique IA réalisée sur volaille domestique sur le Lac Alaotra témoignaient d'une circulation a priori plus intense de l'IA sur la Lac Alaotra que dans la zone d'Antananarivo. La circulation du virus MN était équivalente sur les deux sites et importante.

Détail des résultats provisoires

-Lac Alaotra (35% d'échantillons testés) % de positifs selon les strates écologiques : 0% (sec) ; 2 3,1% (rizières) ; 42,9% (eaux)

-alentours d'Antananarivo (26% d'échantillons analysés) : 5.3% positifs (palmipèdes) ; 2.4% (poule locale)

Virologie

Fin 2008, 730/1094 échantillons ont été analysés en PCR. 16 étaient positifs en VMN et 2 en VIA. Aucun isolement n'était effectué (certains en cours)

Les résultats sérologiques et virologiques justifient ainsi de cibler en partie et en Année II nos activités dans la zone du Lac Alaotra. Nous avons donc réalisé en Novembre 2008 une mission dont l'objectif était d'évaluer la faisabilité d'une mission pluridisciplinaire écologie, épidémiologie, virologie, socio-économie- sur le Lac Alaotra pour obtenir un bilan sanitaire au regard des deux virus considérés, et ce sur toutes les espèces potentiellement impliquées : volaille domestique, avifaune sauvage, porcins. Au terme de cette mission, il a été décidé, et ce en étroite collaboration avec tous les partenaires impliqués, que cette mission serait réalisée fin Avril 2009, période ou les oiseaux sauvages se regroupent sur le lac.

Questions de recherche et méthodologie année 2

Des évènements politiques ont provoqué l'arrêt provisoire des activités pendant 3 mois (Fev, Mars, Avril) 2009. Celles-ci ont repris normalement à partir de Mai 2009.

La plupart des questions de recherche sont identiques à celle abordées en début de projet. Compte tenu des forts taux de prévalence sérologique détecté en VIA sur le Lac Alaotra et du rôle avéré des porcs en Asie du Sud Est dans le cycle épidémiologique de l'IA, il a été décidé d'aborder cette thématique sur le site du Lac Alaotra.

Méthodologie et planning

Volet éco-épidémiologie

- Janvier : saisie des données 2008 et analyse des résultats de l'enquête de prévalence sérologique et virologique sur les 2 sites
- Mars : analyse statistique des données de typologie des élevages et filière
- Mai : Installation en poste (VI) de Marion Jourdan à Ambatondrazaka (Lac Alaotra)
- Mai : mission pluridisciplinaire Lac Alaotra : compte tenu des évènements et des difficultés en résultant pour le suivi ou la mise en place des activités, celle mission n'a concerné que la volaille domestique et l'avifaune sauvage.

  Concernant le volet sauvage, le Lac Alaotra dans son ensemble a été considéré comme étant une seule unité épidémiologique. L'ensemble des prélèvements effectués a reposé sur des captures réalisées au collet par des chasseurs, professionnels ou non, locaux.

Sur un total de **352 oiseaux capturés et prélevés**, une grande majorité (77%) était constituée d'anatidés, avec un nombre significatif de rallidés (16% du total).

Répartis sur les 5 sites du Lac Alaotra déjà visités lors de la première session de screening en 2008, **750 animaux (poulets, canard, oies)** ont été prélevés (écouvillon trachéal et cloacal).

- Aout : étude sérologique et virologique transversale sur porcs

400 porcs ont été prélevés chez 142 éleveurs, entre le 20 juillet et le 12 août. Les prélèvements (sang et écouvillon nasal) ont été réalisés dans les mêmes villages que les prélèvements volailles de manière à pouvoir formuler des hypothèses sur le role de la mixité porc-volaille dans la circulation des virus dans l'environnement, parfois complétés avec des villages voisins. Les analyses virologiques sont en cours à l'Institut Pasteur de Madagascar.

- Septembre : démarrage du suivi sérologique et virologique hebdomadaire des porcs (n=10) en abattoir
- Octobre : comités de thèse H. Rasamoelina et F. Maminiaina
- Novembre :
    - mission cartographie et occupation des sols (L. Guerrini)

Les objectifs de cette mission (19 -29 octobre) étaient de valider la carte d'occupation du sol réalisée à partir d'images Landsat et délivrée par Durell Wildlife Conservation Trust

    - mise en place des suivis longitudinaux et du réseau d'intervention d'urgence

L'objectif de cette activité est de caractériser les circulations virales : virus en cause, profils temporels et variations selon l'environnement (strates). Le plan d'observation envisagé jusqu'à présent prévoit de réaliser des enquêtes dans 3 strates environnementales différentiées par des proportions et natures différentes des zones humides : (1) lac Alaotra, (2) mosaïque de rizières et tanety (collines), et (3) tanety, supposées de risque décroissant vis-à-vis de la transmission des virus de l'IA, voire de MN

Pour atteindre cet objectif, il est envisagé d'échantillonner des animaux (non identifiés individuellement) dans les mêmes élevages à intervalles de 3 mois pendant au moins un an. Trois cents animaux doivent être examinés dans chaque strate à chaque passage, et chaque animal devait faire l'objet d'une prise de sang pour sérologies IA et MN, et d'un écouvillonnage trachéal et cloacal, soit 1.800 sérologies et 1.800 écouvillonnages par passage. L'effectif de 300 animaux a été défini pour permettre la mise en évidence de différences de prévalence sérologique instantanée d'au moins 10% entre chaque strate, sur la base d'une prévalence sérologique instantanée de 40% dans la strate la plus exposée. Pour limiter le coût et surtout la charge de travail de virologie, les écouvillons ne doivent faire l'objet de test RT-PCR pour recherche du génome viral qu'en cas de séroconversions massives révélées par les tests ELISA. Ce protocole sera discuté et validé (moyennant quelques ajustements permettant d'adapter l'objectif à la charge de travail conséquente et aux moyens humains en place actuellement) lors de la mission de V. Chevalier début Décembre 2009.

Les objectifs des interventions sur foyer sont de (i) tracer la dissémination les virus MN et AI à partir des foyers initiaux le long des filières commerciale ; (ii) Valider les modèles théoriques de réseau de commercialisation et (iii) maximiser la probabilité d'isoler et typer les virus MN et/ou AI et évaluer la diversité virale et l'évolution des souches de virus IA ou MN dans l'espace et dans le temps. Cette surveillance se fera sur le site du lac Alaotra, et ce en collaboration avec les Services Vétérinaires AVSF, et vétérinaires privés.

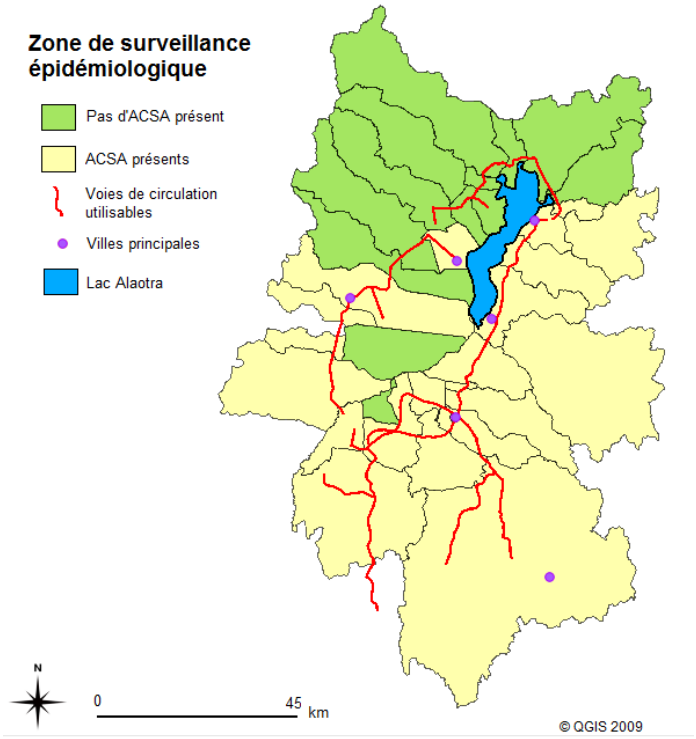

Figure 1 : Localisation de la zone d'intervention sur foyers

Volet virologie

La composante virologique du projet a les objectifs suivants :

- des études de prévalence chez les espèces sauvages, commensales et domestiques au travers d'études virologiques.
- la détection, l'isolement et la caractérisation moléculaire des souches virales à partir de prélèvements faits sur terrain.
- l'étude phylogénétique et phylogéographique des isolats viraux.

Sur le plan méthodologique, la détection moléculaire des gènes M du VIA et du VMN et celle des sous-types se font par des techniques de RT-PCR en temps réel (RRT-PCR). Les échantillons détectés positifs pour le gène M du VMN sont ensuite analysés à l'aide d'une RRT-PCR basée sur le gène F du virus permettant le pathotypage de l'échantillon à l'aide du séquençage utilisé comme outil d'appui.

Tous les échantillons positif VIA ou MN sont soumis à l'isolement sur oeufs embryonnés et, une fois isolée, les produits d'amplification des différentes régions du génome sont caractérisés.

Etat des lieux de l'observatoire fin 2009

Etudes des filières (résultats préliminaires de la thèse D'H. Rasamoelina)

La classification des élevages en fonction des risques de transmission des pathogènes inter-élevages (Figure 2) a permis d'identifier 4 grands types d'élevages : (i) canards gras et poulets gasy en milieu sec et à faible densité ; (ii) oies et autres espèces en milieu humide, bâtiment ouvert, vente au village, taille d'élevage moyenne ; (iii) poules pondeuses, protection sanitaire élevée ; (iV) coqs de combats, claustration, vaccination.

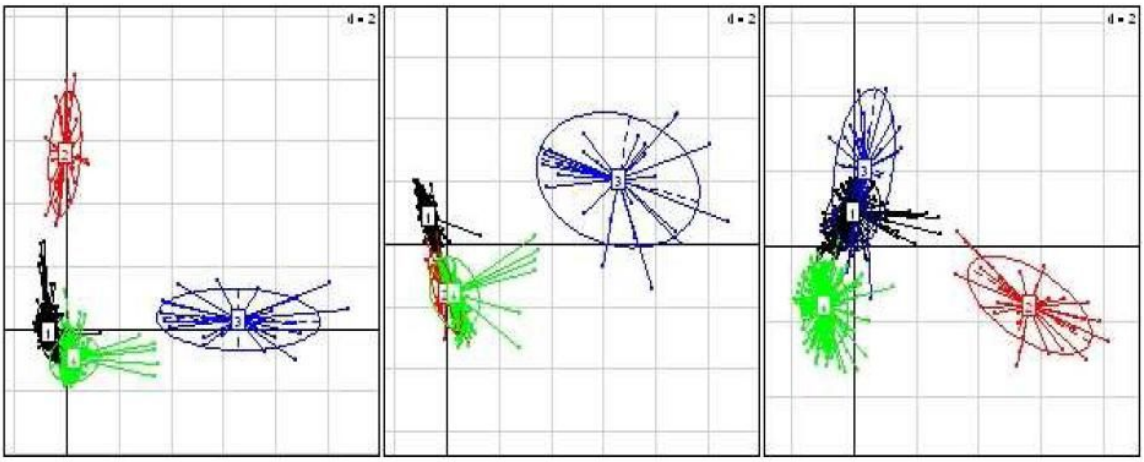

Figure 2 : Typologie selon le risque de transmission inter-élevages des pestes aviaires-Projection des classes d'élevages sur les 3 plans factoriels de l'AFM (extrait de la thèse d' H. Rasamoelina)

La classification de ces élevages au regards de leurs échanges commerciaux avec les autres acteurs de la filière (Figure 3) a permis d'identifier 4 classes , ces classes incluant ou non les classes précédemment décrites : (i) renouvellement et vente à un seul marché ; (ii) pas de relations avec les marchés ; (iii) fortes interaction avec plusieurs marchés, collecteurs, vente au village , vente hors région ; (iv) renouvellement par couvoir, peu de relation avec marchés locaux mais vente hors région, et débouchés fixes

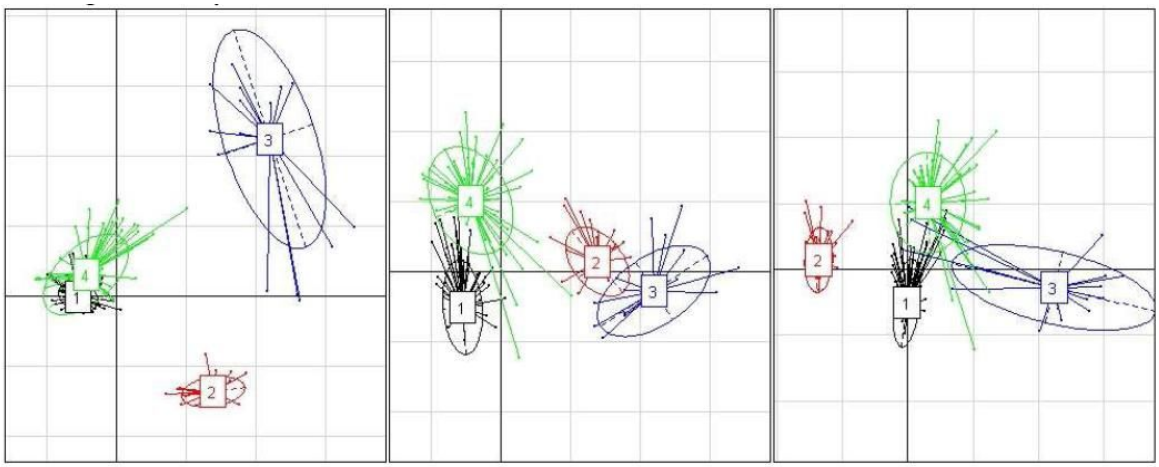

Figure 3 : Relations entre types d'élevage et les réseaux de commercialisation : projection des classes d'élevages sur les plans factoriels de l'ACM (extrait de la thèse d' H. Rasamoelina)

L'étude des relations entre types d'élevage et les réseaux commerciaux (Figure 4) montre qu'il existe 4 types de relations : (i) les **élevages de poulets locaux et de canards gras** achètent et vendent au marché. Ils **fréquentent généralement un seul marché** de type communal, ou de type régional ; (ii) **élevages de coqs de combat** et quelques élevages de poulets locaux. Ne fréquentent pas les marchés. Vendent à des collecteurs ou des débouchés fixes ; (iii) Les **élevages de poules pondeuses** renouvellent leur cheptel par les couvoirs. Entretiennent des relations fixes avec les collecteurs et les débouchés fixes, ainsi qu'avec les marchés hors régionaux ; (iv) les **élevages de palmipèdes et autres** espèces entretiennent de fortes interactions avec les marchés villageois ou communaux.

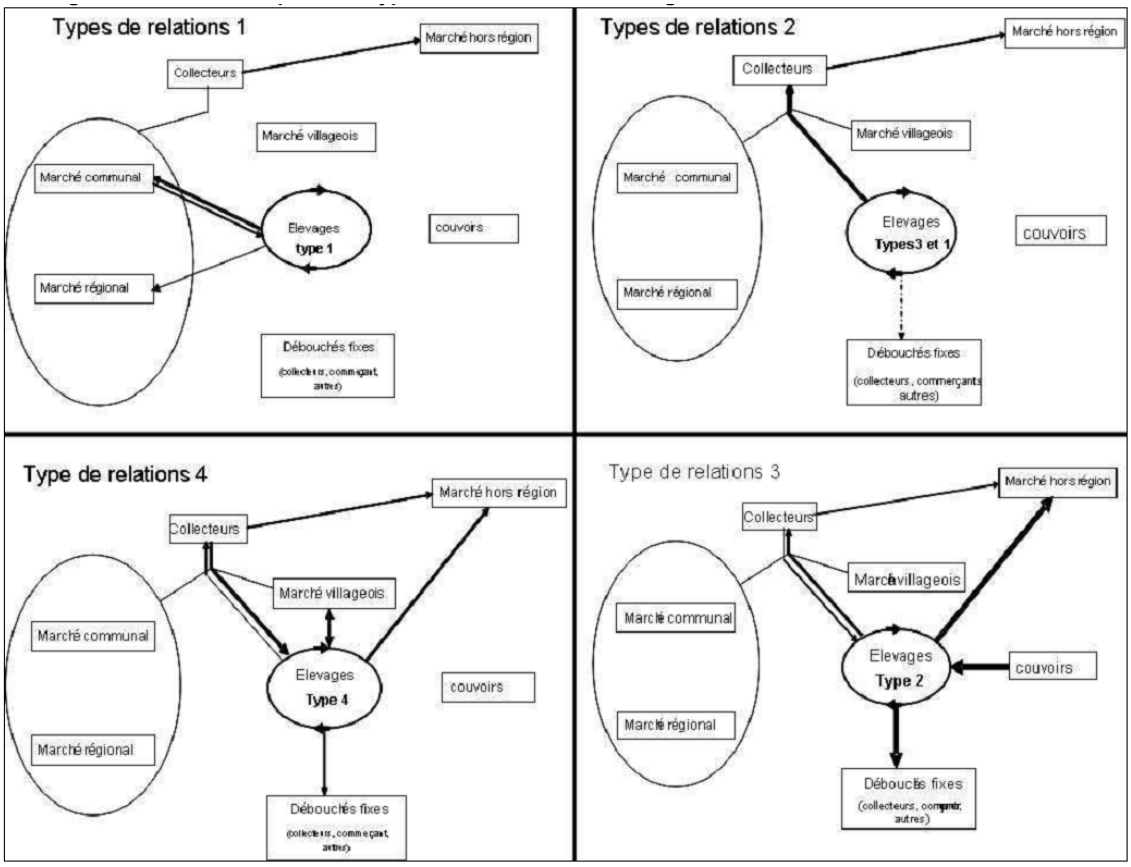

Figure 4 : Caractéristiques des types de relations des élevages avec les circuits de commercialisation l'ACM (extrait de la thèse d' H. Rasamoelina)

Principaux résultats sérologiques

Enquêtes 2008 (IA)

La séroprévalence instantanée en IA était de 9% (n= 1234), tous sites et toutes espèces confondues, avec une séroprévalence apparemment plus élevée chez les canards, oies et canards gras (respectivement 19, 26 et 17%) ;

Sur le site d'Antananarivo, ce taux de prévalence était de 3% (32/933) alors qu'il était de 25% sur le site du Lac (75/301), avec dans els 2 cas des différences notables entre les sous-sites qui restent à investiguer. La recherche des sous-types H5 et H7 s'est révélée négative.

Enquêtes 2008 (VMN)

Pour les animaux non vaccinés, la séroprévalence instantanée en VMN était de 60% (n=778), tous sites et toutes espèces confondues. Les séroprévalences sont plus faibles chez les palmipèdes que les poules. Sur le site de Tana, ce taux était de 56% (n=566). Sur le Lac, ce taux était de 71% (n=197).

Enquêtes 2009

Les échantillons de la mission 2009 (avifaune sauvage et domestique) sont en cours d'analyse, au FOFIFA pour la sérologie, et au CIRAD Montpellier pour la virologie

Principaux résultats virologiques

Domestique

Jusqu'à présent, 360 échantillons prélevés sur la faune domestique en 2009 ont été analysés. Parmi ces échantillons, 19 ont été positifs au VMN ce qui représente une prévalence supérieure à celle trouvée l'année dernière (prévalence prélèvement = 5,2%, prévalence oiseaux = 10,61%) sur des échantillons prélevés d'un à deux mois plus tard dans l'année par rapport à 2009 (juillet-août en 2008 et mai-juin en 2009). Pour l'instant, aucun échantillon domestique n'a été trouvé positif en VIA.

Pour le moment, trois souches VMN ont été isolées sur la campagne de prélèvements domestiques de 2009. D'autres isolements sont en cours.

Des analyses phylogénetiques et moléculaires ont été réalisées sur 6 nouvelles souches du VMN isolées de la faune domestique aux alentours d'Antananarivo et du Lac Alaotra.

L'ensemble des souches NDV isolée et analysées à Madagascar est nommé Groupe MG.

Les analyses phylogénétiques du Groupe MG montrent que le Groupe MG forme un cluster unique en dehors des autres génotypes déjà décrits et présents dans le clade des anciens génotypes responsables de la première épizootie de maladie de Newcastle dans le monde entre 1926 et 1960. Ce Groupe MG dans le clade des anciens génotypes peut constituer un autre génotype que nous proposons comme génotype XI ou lignage 3g. Ce nouveau génotype XI existe dans les deux sites (Antananarivo et Lac Alaotra) d'étude et chez différentes espèces d'oiseaux (Gallus gallus et Anas sp). Toutes les souches du Groupe MG isolées et classées dans le nouveau génotype XI présentent le même site de clivage inédit que la souche MG/1992 (présentés dans le rapport d'activité du projet GRIPAVI, année 1). Le génotype XI semble prédominer lors de manifestations cliniques de la maladie car il a été isolé sur la majorité des animaux malades. Le plus surprenant est que tous ces animaux ont été vaccinés contra la MN. De plus, en incluant une analyse sur les courtes séquences produites (76 à 80pb du gène F) à partir des souches dont l'isolement n'a pas abouti, nous pouvons suspecter la présence d'autres génotypes anciens I et III et du génotype plus récent, le génotype VII circulant actuellement en Afrique et Asie.

Plusieurs hypothèses à confirmer peuvent être émises à l'issue de ces résultats : le nouveau génotype XI pourrait être le génotype le plus prévalent à Madagascar et être responsable des cas cliniques de la MN dans l'ile. La confirmation de la présence du génotype VII, montrerait que des introductions de VMN ont eu lieu après 1980, date où la première épizootie de la MN causée par ce génotype a été signalée pour la première fois en Asie. La présence du génotype III, si elle était confirmée, pourrait être consécutive à une circulation

des virus vaccinaux. Signalons que le vaccin issu de la souche Mukteswar, appartient à ce génotype et est le vaccin le plus utilisé en milieu villageois (surtout chez les coqs de combat).

Sauvage

Parmi 704 échantillons analysés sur la faune sauvage du Lac Alaotra en 2009, 3 ont été trouvés positifs au VMN (prévalence prélèvement = 0,42%, prévalence oiseaux = 0,85%) et 10 positifs au VIA (prévalence prélèvement = 1 ,42%, prévalence oiseaux = 2,84%). Une souche NDV a pu être isolée. La caractérisation moléculaire montre qu'elle s'agit d'une souche lentogène appartenant au génotype I.

Réseaux d'intervention

Le réseau est à présent fonctionnel : définition des suspicions, mise en place du système d'alerte téléphonique et du réseau d'animation, protocole d'intervention (nombre d'animaux à prélever, prélèvements à effectuer, questionnaires, mesure de biosécurité, protection des personnes, Voiture à disposition 7j/7 avec chauffeur, nettoyage et désinfection des roues prévue à chaque sortie sur foyer), autopsies.

Un effort de réflexion reste nécessaire pour ajuster le protocole de prélèvements. En effet les liens existants entre les élevages et la contagiosité des virus étudiés provoquent probablement des réactions en cascade et le nombre d'élevage, et donc d'animaux à prélever, risque très vite de dépasser les capacités diagnostic, que ce soit en termes de temps ou d'argent (les prévisions sont de l'ordre de 500 prélèvements à effectuer par foyers). Il est probable que les premières semaines d'effectivité de ce réseau servent à affiner ces protocoles, et engendrent un engorgement des capacités diagnostic. A ce titre, l'autopsie et le diagnostic différentiel doivent être des outils et méthodes de choix et servir de filtre pour limiter cet engorgement.

Une base de données, conçue et gérée par H. Rasamoelina et M. Jourdan, sera spécialement dédiée au stockage et à la gestion de l'ensemble des données.

Occupation des sols

L'occupation du sol (mode d'affectation de l'étendue à des usages) est une variable essentielle pouvant être reliée à de nombreuses maladies. De nombreuses études ont montré le rôle des facteurs environnementaux dans la transmission et /ou la survie du virus AI [5-8]. Un des objectifs de cette mission est de tester les corrélations entre les types d'occupation du sol et les taux de prévalence obtenus lors des enquêtes sérologiques. Au préalable à ces analyses, la validation de la carte d'occupation du sol est nécessaire. Un total de 30 relevés a été réalisé autour du Lac Alaotra (fig. 5). Une description précise de l'occupation du sol et les coordonnées GPS de chaque relevé ont été réalisées et confrontés aux données existantes.

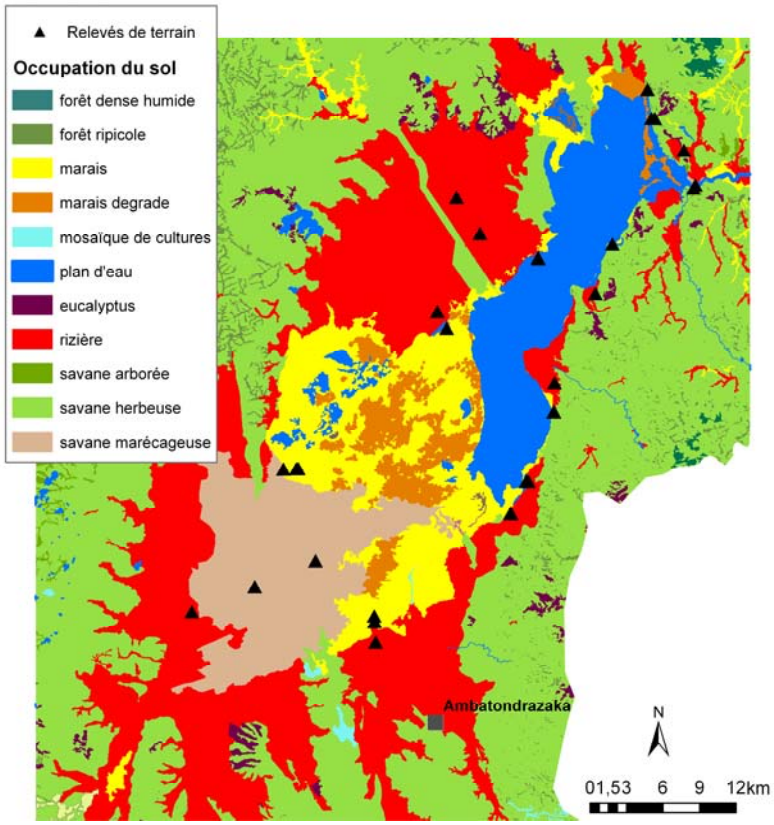

Figure 5 : Cartographie des types d'occupation du sol du Lac Alaotra et spatialisation des 30 relevés de terrain.

La validation révèle une bonne correspondance des relevés de terrain et des unités d'occupation du sol pré définies (86.5%). Les rizières (912 km^2), les marais (397 km^2), les savanes herbeuses (2372 km^2) et marécageuses (233 km^2) sont les principales classes d'occupation du sol observées autour du lac Alaotra. La non concordance de certains relevés provient probablement du fait de la période à laquelle les relevés ont été effectués. La mission s'est déroulée en fin de saison sèche, avec certaines zones de rizières encore non labourées et occupées momentanément par des cultures vivrières. L'idéal serait de réaliser une seconde campagne de relevés en fin de saison des pluies (Mai).

Perspectives

- L'analyse des données des études filières n'est pas terminée. Les prochaines étapes consisteront en une vérification de la distribution spatiales des types d'élevages, classification des élevages concernées par l'enquête de séroprévalence parmi les

types d'élevages identifiés par la classification et valider les taux de prévalence observé par rapport aux prédictions

- Le/les réseaux sociaux seront construits et analysés à partir des données recueillies pendant les enquêtes filières. L'objectif sera de décrire et de modéliser la transmission des virus à travers les réseaux d'acteurs et de valider ces modèles par les résultats des interventions sur foyers.

- L'association séroprévalence (IA et/ou VMN) et types d'élevages identifiés par l'étude de la filière ainsi qu'avec certaine des caractéristiques du milieu sera testée par des méthodes statistiques classiques..

- Un nouveau génotype a été identifié à Madagascar dont l'ancêtre direct est une souche responsable d'une panzootie qui a sévi il y a plus de 50 ans. Le virus correspondant n'a plus été détecté dans le monde depuis plusieurs années. Ce même génotype a été trouvé en 1992 et circule actuellement à Madagascar. Ces résultats mettent en évidence une évolution particulière du VMN à Madagascar par rapport au reste de l'Afrique. Pour confirmer l'hypothèse de que le nouveau génotype XI pourrait être le génotype le plus prévalent à Madagascar et être responsable des cas cliniques de la MN dans l'ile nous envisageons de :

  - analyser les échantillons prélevés pendant le suivi longitudinal mis en place au Lac Alaotra et sur des foyers de MN pour vérifier l'hypothèse de la prédominance du génotype XI dans le cas cliniques de MN à Madagascar ;
  - analyser des nouveaux échantillons prélevés sur la faune sauvage dans l'objectif de connaitre les espèces impliquées dans le maintien, l'évolution et l'émergence des nouveaux génotypes du VMN.

- Les prévalences virologiques en VIA obtenues sur l'avifaune sauvage du lac Alaotra (2009) sont supérieures chez le genre Anas avec 3 positifs sur 45 (6.7%) contre 3 positifs sur 164 (1.8%) chez les 2 espèces de dendrocygne prélevées.

Des facteurs, également importants pour la maladie de Newcastle, sont à prendre en compte du fait de la spécificité de Madagascar pour expliquer ces différences :

- La saisonnalité de ces maladies : cette première campagne nous montre une circulation des virus de peste aviaire à un moment donné de l'année. Mais ces maladies étant saisonnières, il semble désormais nécessaire de procéder à plusieurs campagnes de prélèvements au cours de l'année afin de préciser le profil de circulation de ces virus dans l'avifaune sauvage malgache.

- La dynamique de population (notamment la dynamique des naissances) et les mouvements effectués par l'avifaune sauvage malgache, et notamment de possibles déplacements entre le continent africain et Madagascar sont inconnus : des comptages ornithologiques, la CMR (capture marquage recapture) et la télémétrie satellitaire

pourraient permettre de mieux comprendre cette dynamique de population et de mettre en évidence les principaux déplacements des oiseaux et du rôle potentiel de ces déplacements dans la dissémination des virus. L'isolement de souches AIV pourrait également permettre d'établir un lien entre virus malgaches et virus africains.

- Les contacts avec l'avifaune domestique pourraient expliquer des différences de prévalence dans les populations sauvages.

- Compte tenu de l'avancée des travaux, une **restitution** des résultats sera organisée à Madagascar courant 2010. Les modalités de cette restitution seront discutées dés que l'organisation de cette restitution sera validée par le comité de pilotage.

Chercheurs impliqués sur l'observatoire GRIPAVI Madagascar

CIRAD : V. Chevalier, M. Jourdan, R. Servan de Almeida, J. Cappelle, R. Duboz, M. Figuié, E. Albina, M. Pedrono, L. Guerrini, F. Monicat , S. Molia, G. Balança, P. Gil

FOFIFA : H. Rasamoelina (thèse en épidémiologie, direction S. Morand UR AGIRs, codirection V. Chevalier UR AGIRs, R. Lancelot UMR 15), R. Rakotondravao, F. Maminiaina (thèse en virologie)

Publications

Publié

Servan de Almeida, R., Maminiaina, O. F., Gil, P., Hammoumi, S., Molia, S., Chevalier, V., Koko, M., Andriamanivo, H. R., Traoré, A., Samaké, K., Diarra, A., Grillet, C., Martinez, D. & Albina, E. (2009). Africa, a reservoir of new virulent strains of Newcastle disease virus? *Vaccine* 27, 3127-3129.

En cours

Multivariate analysis to describe poultry farms and their connections with chain market according to their exposition to risk factors of avian influenza and Newcastle disease viruses. Rasamoelina, A.H, Lancelot, R., Jourdan, M., Maminiaina, M., Rakotondrafara, T. F, Tillard, et Chevalier, V

Ecological risk factors of IA and NCD virus presence in Madagascar
V. Chevalier, H. Rasamoelina, L. Guerrini et al

Modelling of the circulation of IA and NCD using SNA in Madagascar
H. Rasamoelina et al

Molecular characterization and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus isolate in Madagascar from 1992 to 2008. Maminiaina OF, Gil P, Briand FX, Albina E , Keita D , Andriamanivo HR , Chevalier V, Lancelot R, Martinez D, Rakotondravao, Rajaonarison JJ, Koko M, Andriantsimahavandy AA, Jestin V , Servan de Almeida R

Références

1. Shelling E et al. Epidemiological study of Newcastle disease in backyard poultry and wild bird populations in Switzerland. Avian Pathology. 1999; 28:263-272.

2. Yee K S, Carpenter T E, Cardona C J. Epidemiology of H5N1 avian influenza. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 2009; 32:325-340.

3. Otim M O et al. A study of risk factors associated with Newcastle disease epidemics in village free-range chickens in Uganda. Trop Anim Health Prod. 2007; 39:27-35.

4. Thompson P N, Sinclair M, Ganzevoort B. Risk factors for seropositivity to H5 avian influenza virus in ostrich farms in the Western Cape Province, South Africa. Prev Vet Med. 2008; 86(1-2):139-152.

5. Gilbert M et al. Avian influenza, domestic duckes and rice agriculture in Thailand. Agriculture, Ecosystems and Environment. 2007; 119:409-415.

6. Gilbert M et al. Mapping H5N1 highly pathogenic avian influenza risk in Southeast Asia. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105(12):4769-4774.

7. Brown J D et al. Avian influenza virus in water : infectivity is dependent on Ph, salinity and temperature. Vet. Microbiol. 2008; 136(1-2): 20-26.

8. Cecchi G et al. Agro-ecological features of the introduction and spread of the highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 in the northern Nigeria. Geospatial Health. 2008; 3(1):7-16.

9. Olsen B et al. Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. Science. 2006; 312(5772):384-388.