Ptičja gripa

Ortrud Werner in Timm C. Harder

Prevod: Marko Kovačević

Uvod

(Zelene povezave: celotni članki, ki so brezplačni)

Visoko patogena ptičja gripa, ali kot izvirni naziv 'ptičja kuga', je bila prvič prepoznana kot nalezljiva bolezen ptic in perutnine v Italiji l. 1878 (Perroncito 1878). Zaradi starega žarišča v zgornjem toku reke Pad v padski dolini, je bila imenovana tudi kot 'Lombardijska bolezen'. Kljub temu, da sta Centanni in Savonuzzi že leta 1901 identificirala filtrabilni agens, ki je odgovoren kot povzročitelj bolezni, to ni bilo priznano do l. 1955, ko je Schäfer opisal te povzročitelje kot viruse gripe A (Schäfer 1955). V naravnih rezervoarjih so gostitelji virusov ptičje gripe divje vodne ptice. Pri njih okužba običajno poteka popolnoma brez simptomov, vse dokler biotipi virusa gripe A nizke patogenosti sobivajo v skoraj popolnem ravnovesju s svojimi gostitelji (Webster 1992, Alexander 2000).

Kadar se nizko patogeni sevi virusa ptičje gripe (LPAIV) prenesejo iz gostiteljskih rezervoarjev na zelo občutljive speciese perutnine, kot so kokoši in purane (je to t.i. transspeciesni korak prenosa!), pri njih povzročijo le blage simptome. Toda v primerih kadar speciesi perutnine podpirajo več ciklusov okužbe, pride pri sevih do serije mutacijskih sprememb, katerih rezultat je nastanek adaptacije – prilagoditve na nove gostitelje. Virusi gripe A, podtipi H5 in H7 ne samo da gredo skozi fazo adaptacije, temveč imajo sposobnost, da skokovito preidejo v visoko patogeno obliko (HPAIV), kar je povzročeno z vstavitvenimi mutacijami. S tem pa povzročijo neustavljivo sistemsko obolenje, ki hitro povzroča smrt. Takšni HPAI virusi lahko nepredvidljivo nastanejo *'de novo'* pri perutnini, ki je okužena z LPAI progenitorji podtipom H5 in H7.

HPAI pri perutnini zaznamuje nenadni začetek, težka prizadetost, ki traja kratek čas ter mortaliteta, ki je pri občutljivih vrstah blizu 100%. Zaradi hkratnih velikih ekonomskih izgub za perutninsko industrijo je na HPAI izjemno pozorna veterinarska stroka in je globalno sprejeto, da se bolezen obvezno prijavlja že pri sumu nanjo. Zaradi potenciala, da lahko preide v HPAI, se obvezno prijavlja tudi LPAI povzročen s H5 in s H7 (OIE 2005). Pred letom 1997 je bila k sreči HPAI redka bolezen, v svetu je bilo od l. 1950 zabeleženih le 24 primarnih epidemij - epizootij (Tabela 1).

Nedavno je ptičja gripa pritegnila pozornost svetovne javnosti. Namreč je visoko patogeni sev podtipa H5N1, (ki verjetno obstaja že pred letom 1997, izvira pa iz južne Kitajske) dosegel enzootski status pri perutnini po celi jugovzhodni Aziji in je nepričakovano 'prečkal medrazredne zapornice' (Perkins in Swayne 2003), kadar se je s ptic prenesel na sesalce (mačke, svinje, ljudi). Čeprav to ni popolnoma nepričakovani dogodek (Koopmans 2004, Hayden and Croisier 2005), je povzročil resno zaskrbljenost glede pandemičnega potenciala seva H5N1 (Klempner in Shapiro 2004; Webster 2006), kajti obstaja znatno število dokumentiranih zbolelih ljudi s težko obliko bolezni in več smrtnih izidov. Obstaja več nadaljnjih dokazov – kar bo pokazano v tekstu, – ki kažejo, da je virus H5N1 dosegel patogensko moč za več vrst sesalcev. To pa je povzročilo upravičeno zaskrbljenost svetovne javnosti (Kaye and Pringle 2005).

Tabela 1: Epizootije HPAIV po svetu v preteklosti[1)]			
Leto	Država/predel	Zajete domače ptice	Sev
1959	Škotska	2 jati piščancev (prijavljeno)	A/chicken/Scotland/59 (H5N1)
1963	Anglija	29,000 rejenih puranov	A/turkey/England/63 (H7N3)
1966	Ontario (Kanada)	8,100 rejenih puranov	A/turkey/Ontario/7732/66 (H5N9)
1976	Victoria (Avstralia)	25,000 kur nesnic, 17,000 brojlerjev, 16,000 rac	A/chicken/Victoria/76 (H7N7)
1979	Nemčija	1 jata s 600,000 piščancev, 80 gosi	A/chicken/Germany/79 (H7N7
1979	Anglija	3 komercialne farme puranov (skupno število ptic ni prijavljeno)	A/turkey/England/199/79 (H7N7)
1983-1985	Pennsylvania (ZDA)*	17 milijonov ptic v 452 jatah; večinoma piščanci ali purani, nekaj jerebic in guinea kokoši	A/chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N2)
1983	Irska	800 poginulih mesnih puranov; depopuliranih 8,640 puranov, 28,020 piščancev, 270,000	A/turkey/Ireland/1378/83 (H5N8)
1985	Victoria (Avstralia)	24,000 brojlerjev, 27,000 kur nesnic, 69,000 brojlerjev, 118,418 piščancev nenavedenega tipa	A/chicken/Victoria/85 (H7N7)
1991	Anglija	8,000 puranov	A/turkey/England/50-92/91 (H5N1)
1992	Victoria (Avstralia)	12,700 brojlerjev, 5,700 rac	A/chicken/Victoria/1/92 (H7N3)
1994	Queensland (Avstralia)	22,000 kur nesnic	A/chicken/Queensland/667-6/94 (H7N3)
1994-1995	Mehika*	skupno število ptic ni na voljo, 360 komercialnih jat kokoši je bilo depopuliranih	A/chicken/Puebla/8623-607/94 (H5N2)
1994	Pakistan*	3.2 miliona brojlerjev in brojlerskih gojencev	A/chicken/Pakistan/447/95 (H7N3)
1997	Hong Kong (Kitajska)	1.4 kur in različnih drugih domačih ptic	A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1)
1997	Novi Južni Wels (Australia)	128,000 brojler breeders, 33,000 brojlerjev, 261 emujev	A/chicken/New South Wales/1651/97 (H7N4)
1997	Italija	Približno. 6,000 kur, puranov, gvinejski kokoši, rac, prepelic, golobov, gosi in jarebic	A/chicken/Italy/330/97 (H5N2)
1999-2000	Italija*	413 farm, približno. 14 milijonov ptic	A/turkey/Italy/99 (H7N1)
2002-2005	JV Azia*	Kitajska, Hong Kong, Indonezija, Japonska, Kambodža, Laos, Malezija, Koreja, Tajska, Vietnam, približno. 150 milijonov ptic	A/chicken/East Asia/2003-2005 (H5N1)
2002	Čile		A/chicken/Chile/2002 (H7N3)
2003	Nizozemska*	Nizozemska: 255 farm, 30 milijonov ptic; Belgija: 8 farm, 3 milijone ptic; Nemčija: 1 farma, 80,000 brojlerjev	A/chicken/Netherlands/2003 (H7N7)
2004	Kanada (B.C.)*	53 jat, 17 milijonov kur	A/chicken/Canada-BC/ 2004 (H7N3)
2004	ZDA (TX)	6,600 brojlerjev	A/chicken/USA-TX/2004 (H5N2)
2004	Južna Afrika	23,700 ratites, 5,000 piščancev	A/ostrich/S.Africa/2004 (H5N2)

[1] Prilagojeno iz Capua in Mutinelli, 2001

* Izbruhi z značilnim širjenjem, so na številnih farmah povzročili velike ekonomske izgube. Večina ostalih izbruhov je bilo omejenih, ali pa se niso širili na ostale farme.

Virusi

Virusi gripe so kroglasti ali podolgovati-elipsoidni delci, ki vsebujejo RNA, ki je enkrat ali večkrat segmentirana z negativno polarnostjo. Virusi gripe imajo spadajo v družino *Orthomyxoviridae,* in sse delijo na tipe A, B ali C na osnovi antigenskih razlik njihovih nukleol in matriksnih proteinov. Virusi ptičje gripe (AIV) pripadajo tipu A. Nedavno je objavljen izjemno dober članek o zgradbi in o načinu replikacije virusov gripe (na pr. Sidoronko and Reichl 2005).

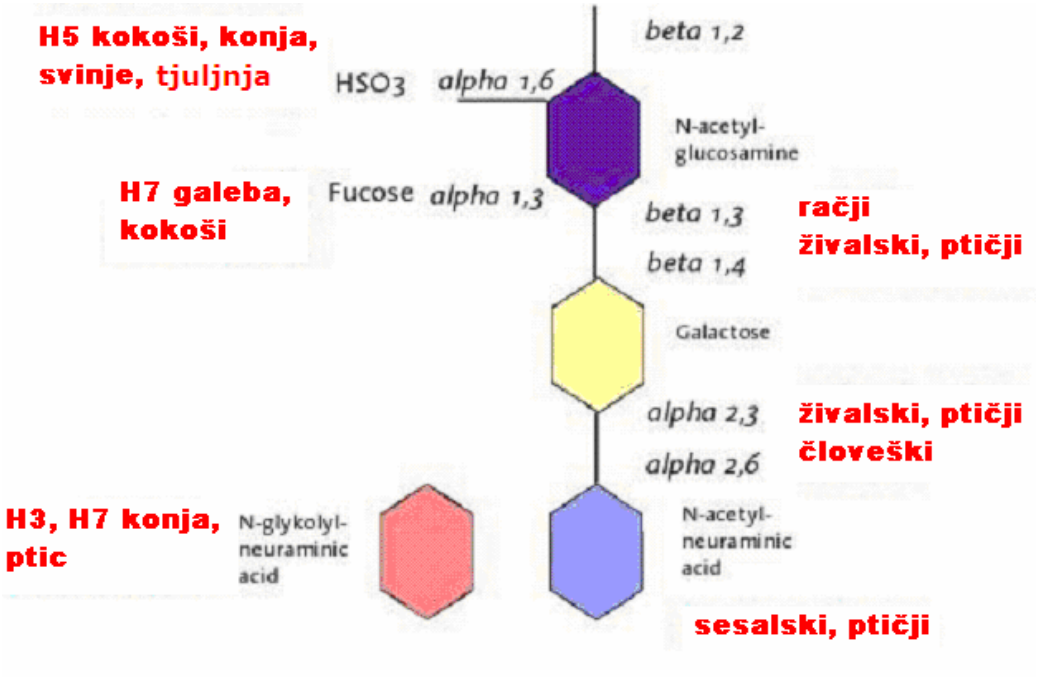
Glavne genetske determinante virusov gripe tipov A in B so hemaglutinski (H ali HA) in nevraminidazni (N ali NA) transmembranski glikoproteini, ki so zmožni izvabiti za podtip specifične in imunske odgovore. Ti imunski odgovori so popolnoma zaščitni pred enim tipom, toda le delno ščitijo pred različnimi podtipi. Na osnovi antigenosti teh glikoproteinov so virusi gripe A danes razvrščeni v 16 H (od H1 do H16) in v 9 N (od N1 do N9) podtipov. Delitev na te skupine je podkrepljena tudi po filogenetični analizi nukleotidov in po razložitvi sekvenc aminokislin HA in NA genov (Fouchier 2005).

Za označevanje izoliranih virusov gripe je po konvenciji potrebno navesti tip virusa gripe, species gostitelja (se ga izpusti, če je humanega vira), geografsko lokacijo, serijsko številko in leto izolacije. Za virus gripe tip A, se v oklepaju doda še podtip hemaglutinina in nevraminidaze. Eden od starševskih sevov virusa ptičje gripe sedanjih epizootij H5N1 azijske linije, je izoloran iz gosi v kitajski provinci Guangdong. V skladu s tem je označen z A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1) (Xu 1999). Izolat, ki izvira iz prvega dokumentiranega primera pri človeku v azijski liniji okužbe s H5N1 iz Hong Konga (Claas 1998), se ozačuje kot: A/HK/156/97 (H5N1).

Hemaglutinin, glikozilirani in acilirani protein, ki se sestoji iz 562 - 566 aminokislin je vgrajen v ovojnico virusa. Globularna glava njegove membrane-njen zunanji del je s vezmi pritrjen za celične receptorje je sestavljen iz oligosaharidov, ki imajo na svojih koncih derivate nevraminske kisline (Watowich 1994). Exodomain – zunanji del drugega transmembranskega glikoproteina - nevraminidaza (NA), uporablja sialolitično encimsko aktivnost in osvobaja –sprošča virusno potomstvo ulovljeno na površini okužene celice tekom njegovega izstopanja iz celice. Ta funkcija preprečuje agregiranje virusa tekom izstopa in verjetno tudi pospešuje prehod virusa skozi sloje sluzi, ki so na ciljnih celicah epitelnega tkiva in vodi k pritrjevanju virusa (Matrosovich 2004a). To povzroči, da je nevraminidaza zanimiva tarča za protivirusna zdravila (Garman and Laver 2004). Za procese učinkovitega pritrjevanja in sproščanja viriona, so ključni medsebojna uglašenost in koordinirane dejavnosti antagonističnih glikoproteinov vrst HA in NA (Wagner 2002).

Pritrjevanje na zunanje proteine celice, virioni gripe A opravijo s pomočjo zrelih trimernih virusnih HA glikoproteinov. Pritrjevanje je slojevito s prepoznavanjem vrst terminalnih različnih sialičnih kislin (N-acetyl- ali N-glycolilneuraminična kislina), tipa glikozidnih spojev s predzadnjo galaktozo (α2-3 ali α2-6) in sestavinami nadaljnih notranjih fragmentov sialiloligosaharidov, ki se nahajajo na površini celice (Herrler 1995, Gambaryan 2005). Pri različnih gostiteljih virusa gripe se iztisnejo različni sialiloligosaharidi, ki jih ovirajo tkiva in sama vrsta. Prilagoditev virusnega HA in NA glikoproteina, na specifične tipe receptorjev določenih vrst gostiteljev je predpogoj za učinkovito razmnoževanje (Ito 1999, Banks 2001, Matrosovich 1999+2001, Suzuki 2000, Gambaryan 2004). To obsega preoblikovanje enot za vezavo receptorjev HA proteina, ki nastaja po interspeciesni transmisiji (Gambaryan 2006). Mehanistični pregled različnih receptorjev je dan na sliki 1. Virusi ptičje gripe splošno kažejo največjo privlačnost za α2-3 spojeno sialično kislino, saj je ta dominantni tip receptorja v epitelnih tkivih v endodermu (črevesje, pljuča) pri pticah, ki so cilji za te viruse (Gambaryan 2005a, Kim 2005). Za razliko od njih se virusi gripe adaptirani na človeka prvenstveno vežejo na 2-6 vezi rezidujev, ki prevladujejo v neciliarnih epitelnih celicah v dihalnih poteh človeka. Te receptorske nagnjenosti so delno definirane z zapornico vrste, ki preprečuje neomejeni prenos virusov ptičje gripe na človeka (Suzuki 2000, Suzuki 2005). Nedavno je bilo dokazano, da v traheji človeka obstaja populacija celic ciliarnega epitela, ki

vsebuje v manjši gostoti receptorjem podobne glikokonjugate za ptičjo gripo, (Matrosovitch 2004b) ter da imajo tudi celice perutnine v manjši gostoti humani tip sialilskih receptorjev (Kim 2005). To bi bilo lahko pojasnilo, da ljudje niso popolnoma neobčutljivi na okužbo z določenimi ptičji sevi (Beare and Webster 1991). Tako sta pri svinjah kot tudi pri prepelicah prisotni obe vrsti receptorjev v večji gostoti, kar povzroča, da bosta ti dve vrsti domnevni mešalni vreči za ptičje in humane seve (Kida 1994, Ito 1998, Scholtissek 1998, Peiris 2001, Perez 2003, Wan in Perez 2005).



Slika 1. Pregled receptorskih nagnjenosti za viruse gripe A (na osnovi podatkov Gambaryan 2005)

Kadar se virion uspešno pripne na ustrezni receptor, bo transportiran v endosomni prostor s pomočjo klatrin odvisnih in klatrin neodvisnih mehanizmov (Rust 2004). Virus se v tem prostoru izogne degradaciji tako, da se spojita virusna in endosomalna membrana: posredovano s transportom protonov skozi proteinske tunele virusnega matriks-2 (M2) tunelskega proteina na pH vrednostih v endosomu okrog 5.0, s kaskado steričnih sprememb v proteinih matriksa-1 (M1) in pričenja homotrimerični HA glikoprotein kompleksa. Rezultat je, da se razkrijejo in izpostavijo visoko liofilne fusogene domene vsake HA monomere, ki se vrinejo v endolizosomno membrano in se s tem začenja fuzija virusne in lisosomne membrane (Haque 2005, Wagner 2005). Kot rezultat tega se v citoplazmo sprosti 8 virusnih genomskih RNA segmentov, ki so v svojem zaščitnem nukleokapsidnem ovoju, sestavljenem iz nukleokapsidnih (N) proteinov (ribonukleoproteinski kompleks, RNP). V citoplazmi jih virusna mRNA transportira v jedro na transkripcijo in na repliciranje genomske RNA, kar je zelo usklajen proces, ki ga zelo delikatno regulirajo virusni in celični dejavniki (Whittaker 1996). RNA-odvisno RNA polimerazo (RdRp) oblikujejo kompleksi virusnih PB1, PB2 in PA proteinov, ki za to nalogo rabijo enkapsidirano RNA (RNPs). Po prepisovanju virusnih proteinov in po oblikovanju nukleokapsid, ki vsebujejo replicirano genomno RNA, novonastali virioni prehajajo skozi celično ovojnico v katero so se že prej vrinili virusni glikoproteini. V montaži heličnih nukleokapsidov in proteinov virusne ovojnice posreduje virusni matrični-1 (M1) protein, ki oblikuje strukture podobne lupini okrog virusne ovojnice. Reprodukcija virusa v popolno dovoljujočih celicah (ki dovolijo razmnoževanje) je zelo hitra (traja manj kot 10 ur). To je zelo učinkovit proces, ki ga omogoča 'optimalna' prisotnost genov(Rott 1979, Neumann 2004).

Pri virusih gripe je ugotovljeno, da zaradi k napakam nagnjene dejavnosti virusne RdRp, je stopnja virusnih mutacij ≥5 x 10^{-5} sprememb nukleotidov na nukleotid in na ciklus replikacije, tako da se približno skoraj 1 nukleotid spremeni na genom na replikacijo (Drake 1993). V primeru delovanja selektivnih pritiskov (kot so nevtralizacijska protitelesa, suboptimalno vezanje za receptorje ali kemične antivirusne snovi) tekom replikacije na nivoju gostitelja ali na nivoju populacije, lahko nastanejo mutanti, ki imajo ustrezne prednosti in nato postanejo dominantni znotraj virusnega kvazispeciesa v tem gostitelju ali v populaciji. Mutanti z ustreznimi selektivnimi prednostmi (na pr. uhajanje nevtralizaciji, preoblikovanje enot za vezavo za receptorje) se lahko izločijo in postanejo dominantne variante . Če so napadene antigenske determinante za membranske glikoproteine HA in NA in sicer z mehanizmi, ki jih vodi imuniteta, se takšen postopni proces imenuje *Antigenski drift* (antigenski premik)(Fergusson 2003).

Antigenski shift (antigenski preskok) pa označuje nenadno in temeljito spremembo antigenskih detrminant, to je spremembo H in/ali N podtipa znotraj enega samega ciklusa replikacije. To se pojavi v celici, ki je sočasno okužena z dvema ali z več podtipi virusov gripe. Razdelitev repliciranih virusnih genomskih segmentov v bodoče virusno potomstvo se pojavlja neodvisno od podtipa virusa vsakega segmenta, tako pride do nastajanja replikacisjko kompetenčnega potomstva, ki v sebi nosi genetske informacije različnih roditeljskih virusov (t.i. reassortanti-potomci s prerazporejenimi geni (Webster and Hulse 2004, WHO 2005). Čeprav so pandemični humani virusi iz l. 1957 (H2N2) in iz l. 1968 (H3N2), brez dvoma nastali z reasortiranjem med humanimi in ptičjimi virusi, izgleda, da virus, ki je povzročil 'Špansko gripo' leta 1918 v celoti izvira iz ptičjega vira. (Belshe 2005).

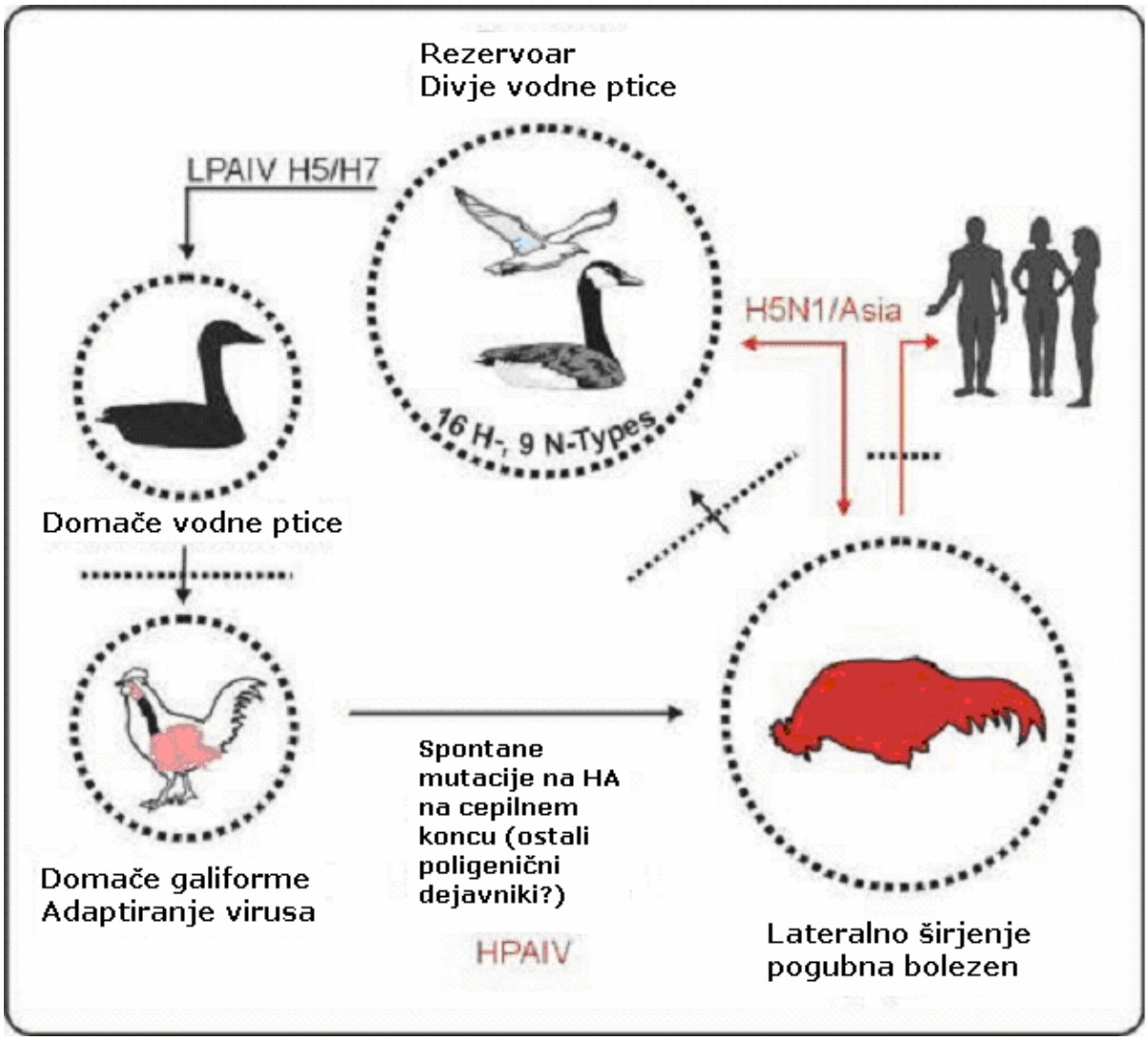
Naravni gostitelji

Nosilke cele vrste različnih virusov gripe podtipa A, so divje vodne ptice, posebej pripadnice reda *Anseriformes* (race in gosi) in *Charadriiformes* (galebi in obalske ptice) in zaradi tega najverjetneje predstavljajo naravni rezervoar vseh virusov gripe A (Webster 1992, Fouchier 2003, Krauss 2004, Widjaja 2004). Čeprav obstaja mnenje, da so vse ptičje vrste občutljive, so nekatere zvrsti domače perutnine – kokoši, purani, pegatke, prepelice in fazani še posebej občutljive na posledice okužbe.

Virusi ptičje gripe tipa A pri svojih naravnih gostiteljih običajno ne povzročajo bolezni. Namesto tega ostajajo v evolucijski stazi (zastoju), kar na molekularni ravni zaznamo z nizkim kvocientom *N/S* (ne-sinononimni vs. sinonimni) mutacij, kar kaže na čisto evolucijo (Gorman 1992, Taubenberger 2005). Zgleda, da gostitelj in virus eksistirata v stanju zelo skrbno uravnovešene tolerance, kar se klinično kaže kot odsotnost bolezni in učinkovito repliciranje virusa. Ob tem gostitelj z blatom izloča ogromne količine virusov, do $10^{8.7}$ x 50% kužne doze za jajce (EID_{50}), na 1 gram blata (Webster 1978). Kadar se virus prenese na zelo občutljive speciese perutnine, se običajno pojavijo blagi simptomi ali jih ni. Virusi tega fenotipa so imenovani kot nizko patogeni (LPAIV) in na splošno povzročajo le blago prehodno znižanje nesnosti pri nesnicah ali pa blago zmanjšanje telesne teže pri rejeni perutnini (Capua and Mutinelli 2001). Vendar podtipi H5 in H7 imajo sposobnost mutiranja v visoko patogeno obliko *po prenosu* in po adaptiranju na nove perutninske gostitelje. Porajanje visoko patogenih oblik H5 in H7 ali pa drugih podtipov ni bilo nikoli ugotovljeno pri divjih pticah (Webster 1998). Zaradi tega bi lahko mislili, da so visoko patogene oblike nekaj umetnega, kar je možno le kot rezultat človekovega vmešavanja v naravno uravnovešeni sistem.

Kadar enkrat pri domači perutnini nastanejo HPAIV fenotipi so se ti zmožni prenašati horizontalno s perutnine nazaj v populacijo divjih ptic. Občutljivost divjih ptic na bolezen povzročeno s HPAIV je zelo različna in variira od vrste do vrste odvisno od starosti in od seva virusa. Do pojava azijskega rodu H5N1 HPAI virusov se je vrnitev HPAIV v populacijo divjih ptic pojavljala sporadično in je bila omejena (z eno izjemo – pogina čiger v Južni Afriki l. 1961 [Becker

1966]), tako da divjim pticam ni bila pripisana epidemiološko pomembna funkcija v širjenju HPAIV (Swayne in Suarez 2000). Od začetka l. 2005 se je to spremenilo iz osnove, ko je nastala velika epizootija pri tisočih divjih pticah v naravnem rezervatu na jezeru Quinhgai na severozahodu Kitajske, ki je bila povezana z azijskim rodom H5N1- HPAI (Chen 2005, Liu 2005). Kot rezultat tega je ugotovljeno možnost za nadaljnje širjenje tega virusa proti Evropi (OIE 2005). Podrobnosti in posledice tega so opisane v tekstu, ki sledi.



Slika 2. Shema patogenze in epidemiologije ptičje gripe

LPAIV – nizko patogeni virus ptičje gripe; HPAIV – visoko patogeni virus ptičje gripe; HA–protein haemaglutin protein; točkaste črte s puščicami predstavljajo speciesne zapornice

Patogeneza HPAI

Patogenost, kot splošna lastnost virusov gripe je poligenična lastnost, ki je med ostalim odvisna od 'optimalne' genske konstelacije napadenega gostitelja in od tkivnega tropizma, od učinkovitosti replikacije in od imunskih mehanizmov izogibanja. Poleg tega specifični dejavniki gostitelja in specifični dejavniki vrste prispevajo k izidu okužbe, kar je po interspeciesnem prenosu *a priori* nepredvidljivo. Visoko patogene oblike ptičje gripe so do sedaj povzročali samo

virusi gripe A podtipov H5 in H7. Vendar so v resnici le nekaj predstavnikov podtipov H5 in H7 visoko patogeni biotipi (Swayne and Suarez 2000). Običajno se v svojih naravnih gostiteljih virusi H5 in H7 stabilno vzdržujejo v nizko patogeni obliki. Iz teh rezervoarjev se virusi preko različnih poti lahko prenašajo na jate perutnine (glej sliko spodaj). Po različnem in za sedaj neugotovljenem obdobju cirkuliranja (in verjetno adaptacije) v občutljivih populacijah perutnine lahko ti virusi skokovito mutirajo v visoko patogeno obliko (Rohm 1995).

Študije zaporedja nukleotidov so pokazale, da večina HPAIV delijo skupne lastnosti svojih HA genov, ki služijo pri perutnini kot marker virulence (Webster 1992, Senne 1996, Perdue 1997, Steinhauer 1999, Perdue and Suarez 2000):

Da bi postali infektivni virioni gripe A, morajo vključiti HA proteine, ki so bili endoproteolitsko obdelani iz prekursorja HA_0 v $HA_{1,2}$ dimer, ki je vezan z disulfidom (Chen 1998). Novonastali N-terminus-konec HA_2 podenote vsebuje fusogeni peptid, ki je sestavljen iz zelo lipofilne domene (Skehel 2001). Ta domena je življenjsko potrebna v teku procesa združitve virusne in liposomne membrane, kajti ta začenja proces prediranja virusnih genomskih segmentov v citoplazmo celice gostitelja. Cepitveni konec HA nizko patogenih virusov je sestavljen iz dveh bazičnih aminokislin na pozicijah -1/-4 (H5) in -1/-3 (H7) (Wood 1993). Ti konci so dostopni za tkivno specifične tripsinu podobne proteaze, ki so večinoma na zunanji strani respiratornega in gastrointestinalnega epitela. Zaradi tega je verjetno pri naravnih gostiteljih v veliki meri omejeno učinkovito repliciranje LPAIV-ijev samo na te konce. Nasprotno temu cepitveni kraj virusov HPAI običajno vsebuje še dodatne osnovne aminokisline (arginin in/ali lizin), ki ga naredi podložnega obdelovanju s subtilizin-podobnimi endoproteazami, ki so specifične za minimalni soglasni niz -R-X-K/R-R- (Horimoto 1994, Rott 1995). Proteaze te vrsti (e.g. furin, proprotein-konvertaze) so aktivne v skoraj vsakem tkivu po celem organizmu. Zaradi tega imajo virusi, ki nosijo takšne mutacije, prednost za neomejeno replikacijo na sistemski način. Ta proces je bil dokumentiran na terenu v več priložnostih. V Italiji je npr. LPAI H7N1 virus več mesecev krožil v populacijah puranov in kokoši, preden je decembra 1999 nepričakovano nastal HPAI H7N1, ki se je od svojega prekurzorja razlikoval le po svojem polibazičnem cepitvenem koncu in je povzročil uničujočo bolezen (Capua 2000).

Predpostavljalo se je, da HA geni H5 in H7 podtipov vsebujejo posebno sekundarno zgradbo RNA, ki podpira insercijske mutacije (kodon duplikacije) s pomočjo rekopiranja enote virusne polimeraze na purinskem koncu in kodira endoproteolitični cepitveni konec teh HA proteinov (Garcia 1996, Perdue 1997). Ta in verjetno še drugi mehanizmi kot so substitucija nukleotidov ali intersegmentne rekombinacije (Suarez 2004, Pasick 2005), lahko povzročijo vgraditev dodatnih bazičnih aminokislinskih ostankov. To zadnje je bilo eksperimentalno dokazano z generiranjem HPAIV iz LPAIV prekursorja, ki je nastal s ponavljanim pasažiranjem *in vivo* s položajno usmerjano mutagenezo (Li 1990, Walker in Kawaoka 1993, Horimoto in Kawaoka 1995, Ito 2001). Nasprotno temu pa odstranjevanje polibazičnega cepitvenega konca s pomočjo reverzne genetike atenuira HPAI fenotip (Tian 2005).

Vendar obstajajo tudi sevi virusa pri katerih se kodiranje zaporedja nukleotidov HA cepitvenega konca ter feno-/patotipa ne ujema na predvideni način: Čilski H7N3 HPAIV, ki je nastal z intersegmentno rekombinacijo razodetih bazičnih aminokislinskih rezidujev le na pozicijah -1, -4 in -6 (Suarez 2004). Podobni primeri obstajajo tudi za rod H5 (Kawaoka 1984). Z druge strani pa je izolat H5N2 iz Teksasa pokazal, da vsebuje soglasni niz za cepitveni niz, toda je klinično klasificiran kot LPAI (Lee 2005). Ti podatki ponovno poudarjajo poligensko in zapleteno patogenost virusa gripe.

K sreči zgleda, da je rojevanje HPAI fenotipov na terenu redek dogodek. Tekom zadnjih 50 let je bilo zabeleženih le 24 primarnih s HPAI povzročenih izbruhov epizootije, ki verjetno *de novo* na takšen način nastaja tudi na terenu (Tabela 1).

Poleg tega je bilo dokazano, da je HPAIV zmožen okužiti sesalce in posebej ljudi. To je bilo posebej ugotovljeno pri azijskem rodu H5N1 (WHO 2006). Patogenost HPAIV H5N1 odvisna od

gostitelja za sesalce, je bila proučevana na več vrstah modelov: miši (Lu 1999, Li 2005a), dihurji ferrets (Zitzow 2002, Govorkova 2005), opice cynomolgous (Rimmelzwaan 2001) in svinje (Choi 2005). Pokazalo se je, da je izid okužbe odvisen od seva virusa in od vrste (species) gostitelja. Izgleda, dihurji zrcalno odražajo patogenost pri človeku, bolj kot miši (Maines 2005).

Izgleda, da so patogenosti deležni številni genetski markerji, ki so locirani v različnih segmentih Z genotipa H5N1 (Tabela 2). Med njimi so mehanizmi interference z mehanizmi prve obrambne črte gostitelja, kot je sistem interferona preko produktov NS-1 gena, ki so postali posebej zanimivi. Eksperimentalno je bilo s pomočjo reverzne genetike dokazano, da so NS-1 proteini nekaterih sevov H5N1, ki imajo glutaminsko kislino na poziciji 92, zmožni preprečiti protivirusne učinke interferona in α-faktorja tumorske nekroze, kar verjetno povzroči spreminjanje replikacije v in do zmanjšanja izpraznitve iz okuženega gostitelja (Seo 2002+2004). Poleg tega je z imunostjo posredovano škodo nastalo zaradi z NS-1-posredovane prekinitve mreže citokinov možno delno pripisati poškodbam pljuč (Cheung 2002, Lipatov 2005). Vendar nobena iz teh mutacij (Tabela 2) sama zase ne predstavlja resničnega predpogoja patogenosti za sesalce (Lipatov 2003). Zaradi tega izgleda, da pri sesalcih v veliki meri s patotipskimi specifičnostmi upravlja optimalna konstelacija genov na način, ki je odvisen od gostitelja (Lipatov 2004).

Tabela 2. Pregled genomskih lokusov, ki bi bili vpleteni v zvišano patogenost za sesalce pri virusih visoko patogenega azijskega rodu H5N1

Gen, Protein	Mutacija	Učinki	Referenca
HA	polibazična endo-proteolitični cepitveni kraj	prednosti za sistemsko diseminacijo in replikacijo (perutnina, sesalci)	različne
NA	19-25 aa delecija v stebernem regionu	adaptacija na razvoj v perutnini in v puranih (?)	Matrosovich 1999, Giannecchini 2006
PB2	627K	spremenjena sistemična replikacija v miših	Hatta 2001, Shinya 2004
	701N	povečana patogenost v miših	Li 2005
PB-1	13P, 678N	spremenjena aktivnost polimeraze; kar je koristno za zgodnji proces species-specifične adaptacije?	Gabriel 2005
NP	319K		
NS-1	92E	olajšano uhajanje prirojenim imunskim odgovorom, pri svinjah zmanjšano izpraznitev virusov	Seo 2004

Klinična slika

Po poteku inkubacijskega obdobja, ki običajno traja nekaj dni (redko več kot 20 dni), odvisno od značilnosti izolata, od inokulacijske doze, od speciesa in od starosti ptice, pri pticah nastane različna klinična slika ptičje gripe. Simptomi so zelo nespecifični (Elbers 2005). Zaradi tega je nemogoče diagnozo temeljiti samo na osnovi klinične slike.

Simptomi, ki nastanejo po okužbi z nizko patogenim AIV, so lahko zelo diskretni, kot je nasršeno perje, začasno zmanjšanje števila znesenih jajc ali izguba telesne teže skupaj z blagim respiratornim obolenjem (Capua and Mutinelli 2001). Nekateri LP sevi kot je azijski rod H9N2, ki so prilagojeni na učinkovito replikacijo, v perutnini lahko povzročijo vidne znake bolezni in tudi značilno mortaliteto (Bano 2003, Li 2005).

V njeni visoko patogeni obliki se pri kurah in puranih bolezen lahko pojavi nenadno s težkimi simptomi in z mortaliteto, ki je blizu 100 % že v 48 urah (Swayne and Suarez 2000). Širjenje znotraj zajete jate je odvisno od oblike reje: v jatah, ki so na stelji in je možen direkten stik in mešanje živali, je širjenje okužbe hitrejše kot je to v pogojih s kletkami, toda potrebno je nekaj dni za popolno okužbo vseh (Capua 2000). Pogosto je zajet le del hleva. Številne ptice poginejo ne da bi kazale predhodne znake, tako da se včasih v začetku posumi na zastrupitev (Nakatami 2005). Treba je omeniti, da nekateri izolati HPAI virusa lahko povzročijo težko obolenje pri eni vrsti ptic, ne pa pri drugi: na tržnicah z živo perjadjo v Hong Kongu pred popolno depopulacijo l. 1997 je HPAIV H5N1 imelo 20 % kokoši in le 2.5 % rac in gosi, dokler so ostale galiformne, vrabci in papagajske vrste bile negativne. Samo kokoši so imele klinično izraženo bolezen (Shortridge 1998).

Pri industrijsko naravnani reji perutnine naglem porastu konzumacije vode in hrane sledi progresivno upadanje konzumiranja, kar je lahko znak za prisotnost bolezni v jati. V jatah nesnic je vidna prekinitev nesenja. Posamezne ptice prizadete s HPAI pogosto kažejo težko apatijo in nemobilnost (Kwon 2005). Vidni so edemi na delih glave nepokritih s perjem, cianoza grebena, podbradka in na nogah, pojavi se driska, ki je zelenkaste barve in otežkočeno dihanje. Pri nesnicah se na začetku pojavijo jajca z mehko lupino, toda z razvojem bolezni se hitro prekine nesenje jajc (Elbers 2005). Znaki živčevja zajemajo tremor, nenavadno držo (torticolis) in težave s koordinacijo (ataxia), ki prevladujejo pri manj občutljivih speciesih kot so race, gosi in ratites (Kwon 2005). Tekom epizootije HPAI v Saksonji, Nemčija l.1979, so gosi prisilno plavale v pravilnih krogih, kar je bil eden od znakov, ki je povzročil sum na HPAI.

Klinična slika okužbe za ptičjo gripo pri človeku je podana v poglavju z naslovom 'Klinična slika gripe pri človeku'.

Patologija

LPAI

Lezije so različne, odvisno od seva virusa in od vrste gostitelja in starosti.Na splošno le purani in kokoši kažejo očitne in mikroskopske spremembe, posebej pri okužbah s sevi, ki so adaptirani na te gostitelje (Capua and Mutinelli 2001). Pri puranih so bili ugotovljeni sinusitis, traheitis in sakulitis, čeprav so možne sekundarne bakterijske okužbe. Pri puranih je opisan pankreatitis. Pri kokoših najpogosteje srečamo lahko prizadetost respiratornega trakta. Poleg tega se pri nesnicah lezije kopičijo na reprodukcijskih organih (ovariji, jajcevod, rumenjaški peritonitis).

HPAI

Makroskopske patološke in histopatološke spremembe HPAI kažejo podobne odvisnosti kot so opisane pri klinični sliki. Navedene so štiri vrste patoloških sprememb (Perkins and Swayne 2003):

(i) Perakutne (znotraj 24-36 ur po okužbi, večinoma pri nekaterih galiformnih speciesih) in akutne oblike bolezni, ki ne kažejo karakterističnih makroskopskih patoloških sprememb: diskretni hidroperikardium, blaga otečenost črevesja in včasih petehialne krvavitve na mezenterični in perikradialni serozi, ki niso vedno opisani (Mutinelli 2003a, Jones in Swayne 2004). Kokoši, ki so bile okužene z rodom azijskega H5N1 imajo včasih v traheji hemoragične lise in znatno količino sluzi (Elbers 2004). Enako tako je možno srečati serozne eksudate v telesnih votlinah ter pljučni edem. Točkaste krvavitve v sluznici proventrikla, ki so jih v preteklosti pogosto opisovali v učbenikih, so se pojavili le izjemoma pri perutnini okuženi z rodom azijskega H5N1 (Elbers 2004). V različnih organih je možno ugotoviti različne histološke lezije skupaj z virusnim antigenom (Mo 1997). Virus so prvič videli v endoteliskih celicah. Pozneje so celice okužene z virusom ugotovili v miokardu, nadledvičnih žlezah in v trebušni slinavki. Okužijo se tako nevroni kot tudi glialne celice možganov. Patogenetski potek je podoben poteku pri okžbah

povzročenih z ostalimi endoteliotropnimi virusi ob katerih aktivacija endotelnih celic in levkocitov vodi k sistemskemu in nekoordiniranem sproščanju citoksinov, kar povzroča nagnjenost k kardiopulmonarnem ali multi-organskemu propadanju (Feldmann 2000, Klenk 2005).

(ii) Pri živalih, ki imajo razvlečen začetek simptomov in podaljšani potek bolezni v sliki bolezni, prevladujejo nevrološki simptomi, histološko pa nesupurativne poškodbe možganov (Perkins in Swayne 2002a, Kwon 2005). Toda virus je možno izolirati tudi iz drugih organov. Takšen potek je opisan pri goseh, racah, emujih in pri drugih speciesih eksperimentalno okuženih z rodom azijskega HPAI H5N1 seva. Pri pticah nesnicah je možno srečati vnetje ovarijev in jajcevodov po rupturi folikla, t.i. rumenjakov peritonitis.

(iii) Pri racah in hišnih vrabcih je ugotovljena le omejena replikacija virusa. Te ptice so kazale blago obliko intersticijske pljučnice, alveolitis in občasno limfocitni in histiocitni miokarditis (Perkins in Swayne 2002a, 2003).

(iv) V eksperimetih Perkinsa in Swayneja (2003) so se golobi in škorci pokazali kot odporni na okužbo s H5N1. Vendar je Wernerju in sodelavcem (bo objavljeno) uspelo pri 5/16 golobih povzročiti dolgotrajno nevrološko obolenje, povzročeno z nesupurativnim encefalitisom (Klopfleisch 2006), uporabljajoč nedavni indonezijski izolat HPAI H5N1.

Diferencialna diagnoza

V diferencialni diagnostiki HPAI je treba upoštevati bolezni, ki lahko povzročijo nenadni začetek bolezni, ki ga spremlja visoka mortaliteta ali pa hemostaza podbradka in grebena:

- velogenična Newcastle bolezen
- infektivni laringotraheitis (kokoši)
- račja kuga
- akutne zastrupitve
- akutna kolera kokoši (Pasteurellosis) in druge septikemične bolezni
- bakterijaki celulitis podbradka in grebena

Manj težke oblike HPAI so lahko še bolj klinično begajoče. Zaradi tega je za vse nadaljne potrebne ukrepe ključnega pomena hitra laboratorijska diagnostika, (Elbers 2005).

Laboratorijska diagnoza

Zbiranje vzrocev

Vzorce je treba zbrati z več svežih kadaverjev in od zbolelih ptic v jati. Idealno je ustrezno vzorčenje na statistični osnovi in postavitev diagnoze na osnovi jate. Kadar se vzorči ptice, ki so sumljive na HPAI, je treba upoštevati varnostne ukrepe zaradi zaščite vzorčevalcev pred potencialno zooantroponoznim HPAIV (Bridges 2002). Navodila je predlagal CDC (CDC 2005).
Za virološke analize je potrebno vzeti brise kloake in brise orofarinksa, kar splošno omogoča ustrezno laboratorijsko preoblikovanje. Vzete brise je treba premešati v 2-3 ml sterilnega transportnega gojišča, ki vsebuje dodane antibiotike in proteine (e.g. 0.5 % [w/v] bovini serum albumin, do 10% bovinega seruma ali brain-heart infusion).
Na avtopsiji, ki se jo izvaja pod varnimi pogoji in pod pogoji preprečitve širjenja bolezni, se za izolacijo virusa vzame vzorce možganov, pljuč, vranice in vsebine črevesja.
Za serološke namene vzamemo vzorce krvi žive živali. Število zbranih vzorcev mora biti takšno, da zagotovi detekcijo s 95 % intervalom zaupanja za parameter s 30% prevalenco.

Transport vzorcev

Brise, tkiva in kri se transportira na hladnem, toda ne smejo zmrzniti. Če se pričakuje, da bo transport trajal več kot 48 ur, je treba vzorce zamrzniti in jih transportirati na suhem ledu. V vseh primerih transportiranja je treba kontrolirati upoštevanje določil varnosti transporta (e.g. IATA

pravila), da se bi izognili širjenju bolezni in akcidentalne okužbe osebja tekom transporta. Pred pošiljanjem vzorcev je o tem potrebno obvestiti laboratorij, še bolj pa pred zbiranjem vzorcev.

Diagnostični postopki

Direktna detekcija okužbe z AIV

V bistvu sta dve (vzporedni) smeri diagnostičnih postopkov s katerimi se poskuša (i) izolacija in subtipizacija virusa s pomočjo klasičnih metod (glej OIE Manual 2005) in (ii) molekularno odkriti in nadrobno opisati genom virusa.

(i) Navadno se izolacijo virusa AI izvaja z inokuliranjem raztopine brisa ali homogenatov tkiva v 9 do 11 dni stara embrionirana kokošja jajca, večinoma skozi horioalantoično vrečko (Woolcock 2001). Odvisno od patološkega tipa lahko embrioni poginejo ali preživijo tekom 5 dnevnega opazovanja. Običajno ni nobenih značilnih lezij niti na embrionu niti na alantoični membrani (Mutinelli 2003b). Jajca, ki se jih inokulira z materialom, ki vsebuje HPAIV običajno poginejo znotraj 48 ur. V zbrani alantoični tekočini je možno odkriti prisotno hemaglutinacijsko snov. Hemaglutinacija (HA) je neobčutljiva tehnika, za katero je nujna prisotnost najmanj $10^{6.0}$ delcev na ml. Če je v inokulumu prisotna majhna koncentracija virusa, je za nekatere seve LPAIV potrebno imeti do dve nadaljni pasaži v embrioniranih jajcih, da bi dobili zadostno število virusov, da se jih odkrije s pomočjo HA. V primeru, da se gre za HPAIV je za optimalno produkcijo hemaglutinacije koristna druga pasaža z uporabo razredčenega inokuluma.

Hemaglutinacijske izolate se antigensko okarakterizira s pomočjo testov inhibicije hemaglutinacije (HI) ob uporabi (mono-) specifičnih antiserumov za 16 H podtipov in za kontrolo za različne tipe ptičjih paramiksovirusov, ki tudi kažejo hemaglutinacijsko aktivnost. Podtip NA je možno naprej določiti s pomočjo reakcij inhibicije nevraminidaze inhibition assays. Za to so spet potrebni podtip specifični serumi (Aymard 2003). V primeru srečanja z izolati iz rodov H5 ali H7 je potrebno, da jim določimo intravenozni indeks patogenosti (IVPI), da razločimo LP in HP biotipe (Allan 1977). Virus, ki je izoliran na jajcih, se inokulira v deset piščancev starosti 6 tednov (0.1 ml 1/10 raztopine alantoične tekočine, ki vsebuje HA titer večji od 1:16). Naslednjih 10 dni se jih opazuje zaradi ugotavljanja pojava kliničnih simptomov. Rezultati so strnjeni v kazalec, ki kaže na HPAI virus, kadar so dobljene vrednosti večje kot 1,2. Druga možnost je, da gre za HPAI izolat, kadar v obdobju opazovnja pogine najmanj 7 od 10 (75%) inokuliranih piščancev.

Z opisanimi klasičnimi postopki se diagnozo AIV postavi v petih dneh, toda včasih sta potrebni tudi dva tedna za izključitev njegove prisotnosti. Poleg diagnostičnih sredstev visoke kvalitete (SPF jajca, H- in N-podtip specifični antiserumi) so potrebni še izkušeni strokovnjaki. Za sedaj ni celičnih kultur za izolacijo AIV, ki lahko dosežejo občutljivost metode na embrioniranih kurjih jajcih (Seo 2001).

(ii) Bolj hiter način je uporaba molekularnih tehnik, posebej kadar je potrebna izključitev okužbe. Tudi te tehnike se vrstijo v kaskadnem slogu: odkrivanje prisotnosti za gripo A specifične RNA se izvaja s pomočjo reakcije reverzne traskriptivne reakcije verižne transkriptaze (RT-PCR), katere cilj so fragmenti M gena, ki je najbolj ohranjeni segment genoma virusov gripe (Fouchier 2000, Spackman 2002) ali gen nukleokapside (Dybkaer 2004). Kadar se dobi pozitivni rezultat se nadaljuje z reakcijami RT-PCR razširjenosti fragmentov gena za hemaglutinin za podtipe H5 in H7, s čem se odkriva prisotnost virusov gripe, ki jih je obvezno prijavljati (Dybkaer 2004, Spackman 2002). Kadar je ta rezultat pozitiven je izvedljiva molekularna diagnoza patotipa (LP proti HP) po sekvencioniranju fragmenta HA gena, ki zajema endoproteolitski cepitveni konec. Izolate pri katerih so prisotne mnogovrstne aminokisline se klasificira kot HPAI. PCR in druge DNA tehnike so bile namenjene za detekcijo sevov H5N1 azijskega roda (Collins 2002, Payungporn 2004, Ng 2005). Možno je identificiranje in ne-H5/H7 podtipov s pomočjo predpisanih RT-PCR, nadaljuje se s sekvenčno analizo HA-2 podenote (Phipps 2004). Obstajajo tudi specifične mase za vsaki NA podtip. Popolno karakterizacijo je možno doseči znotraj 3 dni, posebej, če se uporabi najnovejše PCR tehnike (Perdue 2003, Lee in Suarez 2004). Vendar so DNA čipi še v razvoju in bo to omogočilo brez težavno tipiziranje AI virusov (Li 2001, Kessler 2005). Izključitev diagnoze je možna že v enem dnevu.

Pomanjkljivosti molekularne diagnostike so cena nakupa opreme in materiala, toda možno je analiziranje večjega števila vzorcev z manj osebja v veliko krajšem času v primerjavi z izolacijo virusa na kurjih jajcih. Vendar se ne sme se prikrivati dejstva, da vsaka PCR ali reakcija hibridizacije za razliko od izolacije virusa na jajcih skriva bistveno-notranjo negotovost povezano

s prisotnostjo specifičnih mutacij v danem izolatu na povezovalnih koncih v svoji masi in/ali v poskusnih vzorcih, kar lahko povzroči lažno negativno reakcijo.
Tako kombinacija molekularnih (npr. za namene skrininga) in klasičnih metod (npr. za končno karakteriziranje izolatov in za potrditev diagnoze pri indeksnem primeru), pomaga v kompeziranju slabosti dveh diagnostičnih pristopov.
Hitre analize so oblikovane za namen detekcije virusnega antigena v odtisnih brisih tkiv in kriostatskih odrezkih s pomočjo imunofluorescence ali pa ELISA in sistemov dip-stick lateral flow systems v tekočini brisov. Do sedaj so se te tehnike pokazale kot manj občutljive od izolacije virusa ali PCR. Zaradi tega jih je težko priznati za ustrezne pri potrditvi diagnoze, posebej pri indeksnih primerih (Davison 1998, Selleck 2003, Cattoli 2004). Uporaba t.i. pen side testov v veterinarski praksi je na terenu še vedno na začetkih in jih je potrebno še naprej razvijati.

Indirektna detekcija AIV okužbe

Serologija na osnovi skupine-jate je koristna za namene skrininga (Beck 2003). Za detekcijo AIV specifičnih protiteles v vzorcih seruma ptic ali v rumenjaku pri jatah nesnic je še vedno zlati standard analiza inhibicije hemaglutinacije (HI) s pomočjo referenčnih podtipov antigenov. Skupna specifična protitelesa (influenca virus tip A) proti nukleokapsidnem proteinu je možno ugotavljati tudi s pomočjo agar gel imunoprecipitacije in s pomočjo ELISA (Meulemans 1987, Snyder 1985, Jin 2004). Kompetitivni ELISA formati omogočajo preiskovanje serumov vseh speciesov ptic, neodvisno od razpoložljivosti species-specifičnih konjugatov (Shafer 1998, Zhou 1998). Opisan je ELISA format za detekcijo H7-specifičnih protiteles (Sala 2003), toda za sedaj ni takšnega testa za detekcijo H5 specifičnih protiteles v ptičjih serumih.
Kinetika podtip specifičnih protiteles je odvisna od značilnosti seva virusa in prvenstveno od speciesa gostitelja. Pri kurjih vrstah ptic so lahko AIV-specifična protitelsa ugotovljiva tekom drugega tedna po ekspoziciji; protitelesa v jajčnem rumenjaku so ugotovljiva po nekaj dnevih (Beck 2003). Produkcija in detekcija protiteles pri speciseu *Anatidae* je še bolj variabilna (Suarez in Shultz-Cherry 2000).

Prenos

Prenos med pticami

Virusi ptičje gripe nizke patogenosti imajo pri vodnih pticah stabilen genetski ciklus (Webster 1992). Ciklus okužbe med pticami je odvisen od verig fekalno-oralnega prenosa. Poleg direktnega prenosa z gostitelja na gostitelja je pri sesalcih pomemben indirektni način prenosa z virusi kontaminirano vodo in predmetov iz okolja (ljudje, svinje, konji), kjer prevladuje prenos z aerosoli. Pri pticah je izmerjena največja ekskrecija, ki znaša do $10^{8.7}$ x 50 % infekcijske doze za jajce(EID_{50}) na gram fecesa (Webster 1978). Povprečni titri bodo veliko nižji. Virusi ptičje gripe imajo kljub delikatni morfologiji presenetljivo zmožnost, da obdržijo kužnost v okolju, posebej v površinskih vodah (Stallknecht 1990a+b, Lu 2003). Virusi suspendirani v vodi so obdržali infekcioznost (kužnost) več kot 100 dni pri temperaturi 17°C. Na temperaturi pod -50°C je možno virus hraniti neskončno. Podatki avtorjev Ito in sod. (1995) in Okazaki in sod. (2000) nudijo dokaz, da so virusi ptičje gripe v palearktičnih predelih zaščiteni v zmrznjeni vodi jezer tekom zime brez prisotnosti njihovih naravnih migracijskih gostiteljev. Po svoji vrnitvi se zaradi razmnoževanja v naslednji sezoni ptice ali njihovi (občutljivi) nasledniki ponovno okužijo z virusi, ki se po naključju sprostijo iz odmrznjene vode. Na osnovi teh dejstev se predpostavlja, da se virusi gripe ohranijo v okoljskem ledu tekom dolgih obdobij (Smith 2004) ter da se iz teh rezervoarjev stari virusi in genotipi lahko reciklirajo (Rogers 2004).
Vstop H5 ali H7 podtipov LPAI virusov v občutljive jate perutnine je osnova za verigo okužb, ki lahko pripeljejo do razvoja visoko patogenih biotipov *de novo*. Največje tveganje, da se okužba prenese z divjih ptic na domačo perutnino, je, kadar se domačo perutnino redi na odprtem, kadar ima le-ta skupne vire vode z divjimi pticami ali pa uporablja vodo in hrano, ki je lahko kontaminirana z iztrebki okuženih divjih ptic nosilk virusa (Capua 2003, Henzler 2003). Ptice se okužijo z direktnim stikom z živalmi, ki izločajo virus, s stikom z njihovimi izločki ali s stikom z vektorji (abiotski), ki so kontaminirani z materialom, ki vsebuje viruse. Kadar enkrat vstopi v domačo jato, je LPAIV lahko odvisen od faze adaptacije na perutninski species in ne rabi biti odvisen, da se izloči v količinah, ki zadostujejo, da bo možna horizontalna transmisija znotraj jate in med jatami. Kadar v jati okuženi s LPAI nastane HPAI, se ta širi na enaki način. Tako

imenovani 'mokri' trgi, na katerih se prodaja živa perutnina v pogojih prenatrpanosti, so multiplikatorji širjenja (Shortridge 1998, Bulaga 2003).
Ukrepi za biološko varnost namenjeni izolaciji velikih posestev s piščanci učinkovito preprečujejo prenos okužbe s farme na farmo preko mehaničnih sredstev, kot so kontaminirana oprema, vozila, hrana, kletke ali obleka – posebej pa čevlji. Z analizo epizootije HPAI v Italiji l. 1999/2000 so bila ugotovljena naslednja tveganja za prenos: selitev okuženih jat (1.0%), posredni kontakti tekom prevoza v klavnico (8.5%), bližina okužene jate v radiusu 1 km (26.2%), tovornjaki za prevoz hrane, stelje ali trupel (21.3%), ostali indirektni kontakti tekom izmenjave osebja na farmi, delovne mehanizacije itd. (9.4%) (Marangon and Capua 2005). V tej epidemiji ni bilo namigov o aerogenem širjenju. Vendar so v epizootiji na Nizozemskem (2003) in v Kanadi (2004) upoštevali prenos po zraku (Landman in Schrier 2004, Lees 2004). Vloga živih vektorjev kot so podganje bolhe, ki lahko delujejo kot 'mehanski vektorji', ki sami niso okuženi, ni preveč neosnovana, toda vektorji ne predstavljajo glavnega dejavnika prenosa.
Do pojava azijskega rodu H5N1 HPAIV ponovni prestop HPAIV iz perutnine v populacijo divjih ptic ni imel nobene pomembne vloge. Aprila leta 2005 se je na jezeru Qinghai na severovzhodu Kitajske pojavila bolezen, ki jo je povzročal azijski rod H5N1 in je prizadela na tisoče gologlavih gosi in druge vrste migratornih rac, kormoranov in galebov (Chen 2005, Liu 2005). Zaradi tega je potrebno v prihodnosti računati, da bodo viruse azijskega rodu H5N1 prenašale divje ptice in to upoštevati pri oblikovanju preventivnih ukrepov (sledi diskusija o tem).
Od konca l. 2003 so bili v Aziji ugotovljeni nekateri virusi H5N1, ki so visoko patogeni za kokoši, ne pa za race (Sturm-Ramirez 2005). Pri eksperimentalnih infekcijah s temi izolati je bila dobljena heterogena zmes glede genetične analize in zmožnosti oblikovanja plakov v celičnih kulturah (Hulse Post 2005). Race, ki so preživele okužbo s temi izolati, so do 17 dni izločale virusno populacijo, ki je izgubila patogeni potencial za race. Ob uporabi kliničnih znakov za ugotavljanje prisotnosti HPAIV H5N1 na terenu bi race lahko postale 'Trojanski konj' za ta virus(Webster 2006).

Prenos na ljudi

Prenos virusov ptičje gripe na ljudi, ki povzročajo klinično razpoznavno bolezen je zelo redek pojav(Tabela 3). Glede na dejstvo, da je v jugovzhodni Aziji virusu HPAIV H5N1 potencialno eksponirano na milijone ljudi, je realno število dokumentirano zbolelih majhno, čeprav v zadnjih letih narašča (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/en).
Prva povezava azijskega rodu HPAIV H5N1 s pojavom respiratornega obolenja pri ljudeh je bila ugotovljena l. 1997 v Hong Kongu. Tedaj je bilo 6 od 18 oseb okuženih z virusom H5N1. Zboleli so bili epidemiološko povezani z epizootijo, povzročeno z visoko patogenim H5N1, ki je razsajala na trgih z živimi pticami (Yuen 1998, Claas 1998, Katz 1999). Tveganje direktnega prenosa virusa H5N1 s ptic na človeka kaže, da je največje tveganje pri osebah, ki so v tesnem stiku z živo okuženo perutnino ali s površinami in s predmeti, ki so kontaminirani z njihovimi iztrebki. Tveganje za ekspozicijo je največje pri zakolu, čiščenju perutnine, rezanju na kose in pri pripravljanju perutnine za kuhanje (http://www.who.int/csr/don/2005_08_18/en/). Prisotnost azijskega rodu virusa HPAI H5N1 je bila ugotovljena v vseh tkivih-vključujoč meso-trupel ptic. Večkrat so prijavili, da so osebe, ki so bile pri zakolu ali so pripravljale meso bolnih ptic za konzumiranje, zbolele in umrle, medtem ko drugi člani družine, ki so zaužili takšno hrano niso zboleli (http://www.who.int/csr/don/2005_10_13/en/index.html).
Sev H9N2 je povzročil blago obliko gripi podobnega obolenja pri dveh osebah iz Hong Konga leta 1999 ter pri enem otroku sredi decembra l. 2003 (Saito 2001, Butt 2005). Sev H9N2, ki je v tem času krožil pri perutnini je povzročil pomembne simptome in visoke stopnje smrtnosti pri občutljvih speciesih kot so purani in kokoši.
Do danes ni bilo dokazil, da bi dobro termično obdelano perutninsko meso ali izdelki iz perutnine bili vir okužbe za ljudi z virusi azijskega rodu H5N1. SZO kot splošno pravilo priporoča temeljito termično obdelavo mesa, tako da je meso v vseh notranjih delih segreto na temperaturo 70°C. Na tej temperaturi se virusi gripe inaktivirajo, torej z virusom H5N1 kontaminirano surovo meso postane varno perutninsko meso (WHO 2005).

Tabela 3. Dokumentirane okužbe ljudi z virusi ptičje gripe *					
Datum	Država/predel	Sev	Zbolelo (umrlo)	Simptomi	Vir
1959	ZDA	H7N7**	1	Respiratorni	Potovanje v tujino
1995	VB	H7N7	1	Konjunktivitis	Hišne race (delile si jezero z migratornimi pticami)
1997	Hong Kong	H5N1**	18 (6)	respiratorni/ pljučnica	Perutnina
1998	Kitajska (Guangdong)	H9N2	5	Nepoznani	Nepoznano
1999	Hong Kong	H9N2	2	Respiratorni	Perutnina, nepoznano
2003(Feb.)	Hong Kong	H5N1**	2 (1)	Respiratorni	Nepoznano
2003 (Mar.)	Nizozemska	H7N7**	89 (1)	konjunktivitis (pljučnica, respiratorna odpoved pri fatalnih primerih)	perutnina
2003 (Dec.)	Hong Kong	H9N2	1	respiratorni	nepoznan
2003	New York	H7N2	1	respiratorni	nepoznan
2003	Vietnam	H5N1**	3 (3)	respiratorni	perutnina
2004	Vietnam	H5N1**	29 (20)	respiratorni	perutnina
2004	Tajska	H5N1**	17 (12)	respiratorni	perutnina
2004	Kanada	H7N3**	2	konjunctivitis	perutnina
2005	Vietnam	H5N1**	61 (19)	respiratorni	perutnina
2005	Tajska	H5N1**	5 (2)	respiratorni	perutnina
2005	Kitajska	H5N1**	7 (3)	respiratorni	perutnina
2005	Kambodža	H5N1**	4 (4)	respiratorni	perutnina
2005	Indonezija	H5N1**	16 (11)	respiratorni	perutnina
2006	Turčija	H5N1**	3 (3)	respiratorni	perutnina

* Vir: Avian influenza - assessing the pandemic threat. WHO, http://www.who.int/csr/disease/influenza/WHO_CDS_2005_29/en/, prevzeto 06 January 2006.
** Visoko patogen za perutnino

Prenos na sesalce

Virusi ptičje gripe so v več priložnostih povzročili okužbo različnih vrst sesalcev. Tudi pri njih je možno, da je po ciklusu replikacij in adaptacij utemeljitev novih epidemičnih rodov. Svinje so bile posebej pogosto vključene v te 'medrazredne transverzije'. V populacijah evropskih svinj prevladujejo virusi podobni ptičji gripi H1N1 (Heinen 2002), ter virus H1N2, ki je reasortirani humano-ptičji virus. Prvič so ga izolirali v Veliki Britaniji l. 1992 in je od tedaj stalno prisoten (Brown 1998). V ZDA cirkulira trojno reasortirani (H3N2) med klasičnim H1N1, človeškim H3N2 in ptičjim podtipom (Olsen 2002). Ostali podtipi, ki so verjetno ptičjega porekla (npr. H1N7, H4N6), so bili pri svinjah le redkoma ugotovljeni (Brown 1997, Karasin 2000). Virus ptičjega porekla H9N2 je zmerno razširjen v populacijah svinj na vzhodu Kitajske (Xu 2004). Od ptic se z virusi gripe A lahko okužijo še morski sesalci in konji (Guo 1992, Ito 1999).
Naravna okužba s H5N1 je bila opisana pri tigrih in pri drugih velikih mačkah v živalskem vrtu na Tajskem, kajti živali so hranili s perutninskimi kadavri, ki so bili okuženi z virusom (Keawcharoen 2004, Quirk 2004, Amosin 2005). Posledica je bila težka oblika bolezni z visoko mortaliteto. V istem živalskem vrtu je prišlo do prenosa z mačke na mačko (Thanawongnuwech 2005). To je bil

prvi prijavljeni primer okužbe z virusom gripe pri *Felidae*. V Evropi so z virusom H5N1 v eksperimentalnih pogojih okužili hišne kratkodlake mačke (Kuiken 2004).
Leta 2004 je bilo v Vietnamu zbranih 3.000 vzorcev serumov prostih potepuških svinj, ki so jih testirali zaradi iskanja dokazil o njihovi eksponiranosti virusu gripe H5N1 (Choi 2005). Z metodami nevtralizacije in Western blot so potrdili seropozitivnost le pri 0.25% vzorcih. Pri eksperimentalnih okužbah je bilo dokazano, da je možna okužba svinj z virusi H5N1, ki so bili izolirani l. 2004 v Aziji in so humanega ali ptičjega vira. Edini simptomi, ki so se pojavili 4 dni po okužbi, so bili blagi kašelj in povečana telesna temperatura. Virus je možno izolirati iz tkiv zgornjih dihal vsaj 6 dni. Višek titrov virusov v brisih nosu je ugotovljen 2 dni po okužbi, toda nobena eksperimentalno okužena žival okužbe ni prenesla na svinje iz kontakta. Izgleda, da so visoko letalni H5N1 virusi, ki krožijo po Aziji, zmožni okužiti svinje po naravni poti. Vendar je incidenca takšnih okužb zelo nizka. Nobeden od testiranih ptičjih ali humanih H5N1 virusov se v eksperimentalnih pogojih ni prenašal med svinjami (Choi 2005). Na osnovi teh ugotovitev je verjetno, da svinje trenutno nimajo pomembne vloge v epidemiologiji azijskega rodu H5N1.
Epizootija visoko patogene H7N7 ptičje gripe je pri perutnini na Nizozemskem, v Belgiji in v Nemčiji spomladi l. 2003 povzročila okužbo pri 89 delavcih, ki so bili izpostavljeni okuženim živalim in kadavrom. Opisan je pojav blage oblike bolezni, pretežno konjunktivitis. (Koopmans 2004). Okužba je pri enem veterinarju povzročila akutni dihalni distres sindrom in je imela smrtni izid. (Fouchier 2004). Tekom epizootije na Nizozemskem je bila okužba s H7N7 virološko in serološko potrjena še pri večjemu številu hišnih kontaktov, od tega so štirje imeli konjunktivitis (Du Ry van Beest Holle 2005). Dokazi o okužbi (asimptomatski) ljudi po naravni poti z LPAIV sevi podtipov H9, H7 in H5 so opisani tudi v drugih priložnostih v Italiji in na Japonskem (Zhou 1996, Puzelli 2005, Promed 20060110.0090).
V nepotrjenem poročilu (Promed Mail 20050826) je bila omenjena okužba s H5N1 s smrtnim izidom pri 5 redkih cibetovkah rojenih v kletki v nacionalnem parku v Vietnamu. Vir okužbe je ostal nerazjasnjen. Preostalih 20 cibetovk iste vrste, ki so jih držali v sosednjih kletkah, ni zbolelo.
Virusov ptičje gripe nikoli niso ugotovili pri podganah, zajcih in pri različnih drugih sesalcih, ki so prisotni na trgih z živimi pticami v Hong Kongu, kjer so ugotovili, da je 20% perutnine pozitivne na azijski rod H5N1 (Shortridge 1998).

Epidemiologija

Perutnina

Do konca l. 2003 je prevladovalo mnenje, da je HPAI redka bolezen pri perutnini. Od leta 1959 je bilo v svetu registriranih le 24 epizootij (tabela 1). Večina se jih je pripetila v Evropi in na ameriškem kontinentu. Večina epizootij je bilo geografsko omejenih. Le 5 se jih je razširilo na številne farme in le ena se je širila v mednarodnih razmerah. Nobena od njih ni bila niti blizu velikosti epizootij v Aziji povzročenih s H5N1 v letu 2004 (WHO 2004/03/02). Do sedaj so bile vse epizootije visoko patogene oblike z virusi gripe A podtipov H5 in H7.
V epizootijah v preteklosti so bili glavni dejavniki širjenja HPAIV nelegalna prodaja ali prevoz okuženih živih ptic ali nepredelani izdelki, nenamerni mehanski prenos virusov z gibanjem ljudi (potniki, begunci).
Nova dimenzija epizootij HPAI se pojavi koncem l. 2003. Od srede decembra l. 2003 do začetka februarja 2004 so bile epizootije pri perutnini povzročene s HPAI H5N1 azijskega rodu prijavljene v R. Koreji, Vietnamu, na Japonskem, na Tajskem, v Kambodži, Laosu, Indoneziji in na Kitajskem. Sočasen pojav velikih epizootij pri domači perutnini v več državah do sedaj ni opisan. Vsa prizadevanja usmerjena na brzdanje bolezni so bila neuspešna. Kljub zbiranju in uničenju okrog 150 milijonov ptic, je sedaj H5N1 postal endemičen v številnih delih Indonezije in Vietnama, ter v nekaterih predelih Kambodže, Kitajske, Tajske in verjetno v Laosu.
Izviren virus prvič ugotovljen l. 1997 je iz reasortiranih staršev, vključujoč najmanj virus H5N1 iz domačih gosi (A/goose/Guangdong/1/96, ki je podaril HA) in H6N1 virus najverjetneje iz divjih rac (A/teal/Hong Kong/W312/97, ki je podaril NA in segmente za notranje proteine), ki je prestal veliko več ciklusov reasortiranja z drugimi nepoznanimi virusi ptičje gripe (Xu 1999, Hoffmann 2000, Guan 2002b). Opisanih je več različnih genotipov H5N1 rodu (Cauthen 2000, Guan 2002a+2003). Tako imenovai genotip 'Z' je dominiral v epizootijah od decembra 2003 (L 2004).
V aprilu l. 2005 je prišlo do še enega epizootskega nivoja zbolevanja, ko je sev H5N1 dobil široki dostop k populacijah divjih ptic (Chen 2005, Liu 2005). Na jezeru Qinghai na severozahodu

Kitajske je več tisoč migratornih gologlavih gosi podleglo okužbi. Zajetih je bilo tudi več vrst galebov in kormoranov. Ko so bile prvič prijavljene epizootije H5N1, poleti in jeseni 2005 v geografsko sosednji Mongoliji, Kazahstanu in v južni Sibiriji, so bile za širjenje okužbe osumljene ptice selivke. Nadaljne epizootije se koncem l. 2005 pojavijo vzdolž in med pokrivajočimi se migratornimi potmi iz notranje Azije, v smeri Srednjega Vzhoda in Afrike. Leta 2005 so prizadele Turčijo, Romunijo, Hrvaško in polotok Krim. V vseh primerih (razen Mongolije in Hrvaške) so bili zajeti perutnina in divje vodne ptice. Indeksni primer (prvi primer) se pri perutnini pogosto pojavi pri perutnini, ki je v bližini jezer in močvirij nastanjenih z divjimi vodnimi pticami. To kaže na direktno namigovanje, da migratorne ptice širijo virus, vendar je treba pripomniti, da je azijski rod virusa HPAI H5N1 do sedaj bil ugotovljen pri umirajočih ali že mrtvih vodnih pticah. Resnični status H5N1 v populacijah divjih vodnih ptic in njihova vloga v širjenju okužbe ostaja skrivnostna. Danes je možno le špekuliranje o tem ali so divje vodne ptice zmožne nositi virus na velike razdalje tekom inkubacijskega obdobja, ali pa res nekatere vrste ostajajo mobilne kljub okužbi s H5N1.
Medtem so študije na Kitajskem pokazale prisotnost več novih genotipov azijskega rodu virusa H5N1 pri 3 vrabcih (Kou 2005). Nobenih simptomov okužbe niso kazali ne vrabci iz katerih so bili virusi izolirani kot tudi ne z njimi eksperimentalno okužene race. Vendar je po prenosu na kokoši izzvan popoln HPAI. Različni vrabci iz iste jate nosijo več različnih genotipov, ki verjetno nastajajo z reasortiranjem z različnimi AI virusi nepoznanih značilnosti. Obstaja sum, da so virusi podobni H5N1 nekoč prej že bili preneseni na te ptice (pred meseci?). To kaže na še en korak poslabšanja situacije: vrabci so zaradi svojih življenjskih navad idealni posredniki med divjimi pticami in domačo perutnino in lahko prenašajo HPAI viruse med temi populacijami. Lokalno omejena okužba z visoko patogenim HP H5N1 pri posameznih (zbolelih ali poginulih) vrabcih je bila ugotovljena tudi na Tajskem in v Hong Kongu. Endemičnost HPAIV pri pticah selivkah, kot so vrabci, škorci, lastovke, ki živijo v tesni povezanosti z naselbinami ljudi, ne bodo predstavljale le ogromnega pritiska na lokalno perutninsko industrijo, ampak bo povečala tveganje ekspozicije za ljudi (Nestorowicz 1987).

Ljudje
Do 30.12.2005 je bilo registriranih 142 ljudi zbolelih za H5N1. Epidemija je za sedaj omejena na Kambodžo, Indonezijo, Tajsko in žarišče v Vietnamu (65.5 % vseh zbolelih).Umrlo je 72 (50.7 %) oseb.
Za več podrobnosti glej poglavje "Epidemiologija".

Ekonomske posledice
Epizootije visoko patogene ptičje gripe lahko v zajetem predelu povzročijo katastrofalne posledice za posamezne rejce in za perutninsko industrijo v celoti (glej tabelo 1). Ekonomske izgube so običajno le delno povzročene zaradi neposrednega pogina perutnine zaradi okužbe s HPAI. Ukrepi, ki se jih mora izvajati zaradi preprečevanja širjenja bolezni so obvezni in temeljiti. Enako tako lahko v državah v razvoju pride do uničujočih posledic v prehrani, kajti perutnina je pomemben vir proteinov živalskega vira. Kadar se epizootija razširi, jo je zelo težko obvladati in je za obvladovanje potrebno kar nekaj napora (WHO 2004/01/22).

Ukrepi za obvladovanje HPAI
Zaradi potencialno uničujočih ekonomskih posledic, ki jih lahko povzroči,je HPAI pod pozornim opazovanjem po celem svetu, kar je tudi uzakonjeno. Bolezen se obvezno prijavlja. (Pearson 2003, OIE Terrestrial Animal Health Code 2005). Ukrepi, ki se jih izvaja so odvisni od epizootološke situacije v zajetem regionu. V Evropski skupnosti (EU) HPAIV ni endemičen in je prepovedano profilaktično cepljenje proti ptičji gripe. Potemtakem se pričakuje, da bodo epizootije HPAIV pri perutnini očitne zaradi klinično uničujočega poteka bolezni. Kadar se sooči z epizootijo, se izvaja agresivne ukrepe obvladovanja, npr. označevanje zajetih in kontaktnih posestev s ciljem takojšnje eradikacije virusa HPAI in omejevanje epizootije na indeksnem posestvu.
Za te namene se postavijo cone obvladovanja in nadzora okrog indeksnega primera s premerom, ki je različen v različnih državah (v EU je to 3 km in 10 km). Standardni ukrepi obvladovanja za preprečevanje bočnega širjenja na druge kmetije so karantena okuženih in kontaktnih kmetij,

hitro uničevanje vseh okuženih ali eksponiranih ptic ter ustrezno odstranjevanje trupel (OIE - Terrestrial Animal Health Code). V teku epizootije je ključnega pomena onemogočanje premika žive perutnine in perutninskih izdelkov znotraj države in med državami.
Poleg tega se v neendemskih predelih priporoča obvladovanje podtipov H5 in H7 LPAI pri perutnini s testiranjem in z uničevanjem akutno okuženih poslopij. S tem se v takšnih poslopjih zmanjšuje tveganje za nastanek in razvoj HPAIV.
Lahko se pojavijo specifični problemi takšnega načina eradikacije v predelih (i) z visoko gostoto populacije perutnine (Marangon 2004, Stegemann 2004, Mannelli 2005) (ii) kjer prevladujejo majhna dvorišča s perutnino na prostosti (Witt and Malone 2005). Zaradi tesne neposredne bližine poslopij s perutnino in prepletene strukture predelave je širjenje bolezni hitrejše kot so ukrepi za eradiciranje. Zaradi tega tekom epizootije v Italiji 1999/2000 niso uničevali samo okuženih in kontaktnih poslopij, ampak tudi jate s tveganjem za okužbo, ki so bile znotraj premera 1 km od okuženega poslopja. Vendar je takšna eradikacija trajala 4 mesece in je bilo uničenih 13 milijonov ptic (Capua 2003). Uspešno eradikacijo HPAIV na Nizozemskem l. 2003 in v Kanadi l. 2004 so dosegli z ustvaritvijo buffer cone široke od 1 do več kilometrov okrog okuženih poslopij. S tem so popolno zajeli vso perutnino. Ob tem je bilo uničeno 30 milijonov oziroma 19 milijonov ptic. Leta 1997 so v Hong Kongu v treh dneh pobili celotno populacijo perutnine (29., 30., in 31.decembra; 1.5 milijonov ptic). Ukrepi so imeli namen takojšnje eradiciranje HPAIV za ceno uničenja tudi neokuženih živali, kar je izvedljivo na komercialnih poslopjih in v urbanih pogojih. To zelo prizadene perutninsko industrijo v buffer conah in povzroča pomisleke javnosti o etičnosti pobijanja milijonov zdravih in neokuženih živali.
Ukrepe je najtežje izvajati v ruralnih predelih s tradicionalno obliko reje perutnine na prostem. Kajti perutnina se na prostem lahko srečuje z divjimi pticami ali ima z njimi skupne vire vode. Poleg tega domače race privlačijo divje race in s tem pripravijo pomemben povezovalni člen v verigi prenosa med divjimi pticami in domačimi jati (WHO 2005). Takšne okoliščine lahko zagotovijo dobra tla HPAI virusom, da dosežejo endemsko stanje.
Endemičnost HPAI predstavlja v določenih regionih stalen pritisk na perutninarstvo. Zgoraj omenjenih restrikcij ni možno vzdrževati tekom daljšega obdobja ne da se povzroči odločilno škodo državni perutninski industriji. V državah v razvoju restrikcije povzročajo primanjkljaj v oskrbi prebivalstva s proteini. Zaradi tega je nujno izvajanje drugih ukrepov.
V takšnih okoliščinah so izvajali splošno cepljenje, kar je še eno dodatno orodje v postopku eradikacije epizootij v neendemskih območjih.

Cepljenje

Cepljenje v veterini ima 4 cilje: (i) zaščita pred klinično boleznijo, (ii) zaščita pred okužbo z virulenčnim virusom, (iii) zaščita pred izločanjem virusa in (iv) serološko **d**iferencirnje-ločevanje **i**nficiranih od **v**akciniranih živ**a**li (t.i DIVA vodilo).
Na področju cepljenja proti gripi teh zahtev niso izpolnila cepiva, ki so v komercialni rabi, kot niti cepiva, ki so v eksperimentalnih testiranjih (Lee and Suarez 2005). Prvi cilj – zaščito pred klinično boleznijo povzročeno s HPAIV doseže večina cepiv. Doseže se preprečitev tveganja za okužbo cepljenih, toda se običajno zmanjša izločanje virulenčnega terenskega virusa, ne pa prepreči. To lahko v endemskih območjih, v katerih se izvaja masovno cepljenje, povzroči značilen epidemiološki problem. Cepljene ptice, ki se kažejo zdrave, so lahko okužene in lahko izločajo divji virus pod 'krinko'. Učinkovitost zmanjšanja izločanja virusa je pomembna za glavni cilj ukrepov obvladovanja, to je eradikacijo divjega virulenčnega virusa. Učinkovitost je možno kvantificirati s pomočjo dejavnika r0. Pod predpostavko, da cepljena in okužena jata okužbo prenaša v povprečju na manj kot eno jato (r0< 1) je virulenčni virus na matematičnih temeljih naklonjen iztrebitvi (van der Goot 2005). Kadar imamo opraviti s cepljenjem proti potencialno epizoonotskim H5N1 virusom redukcija ekskrecije virusa tudi reducira tveganje prenosa na ljudi, kajti kaže, da je potrebna velika doza, da bi prebila speciesno oviro med pticami in ljudmi. Poleg vsega DIVA tehnika pri cepljenih pticah omogoča sledenje okužb z divjim virusom s pomočjo serologije. Pri praktični rabi je treba opazovati več elementov (Lee and Suarez 2005):

- Cepiva ne smejo vsebovati virusov zmožnih repliciranja zaradi potenciala genetskega reasortiranja enako kot v primerih potipov H5- in H7- tveganje za spontane mutacije, ki vodi k povečani patogenosti. Zaradi tega so prepovedana živa atenuirana cepiva.

- Zaščita perutnine pred HPAI je v veliki meri odvisna od HA-specifičnih protiteles. Zaradi tega mora biti cepilni sev istega H podtipa, kot je divji virus. Idealno skladanje cepilnega in divjega virusa pri perutnini ni nujno, kot je to nujno pri cepivih za ljudi. Pri perutnini zadostuje indukcija homopodtip navskrižno reaktivna imuniteta zaradi sedanjega pomanjkanja s cepivom vodenega antigenskega drifta pri virusih ptičje gripe, kar je povzročeno z neizvajanjem masovnega cepljenja.
- Obvezna je uporaba markerja (DIVA) postopka (Suarez 2005). Alternativno se za monitoring lahko uporablja sentinel ptice, ki niso bile cepljene.

Do sedaj je pripravljen cel kup različnih konceptov cepljenja. Večina jih še vedno temelji na inaktiviranem cepivu iz celotnega virusa z adjuvantom, ki se ga mora aplicirati z iglo in z brizgalko vsaki živali posebej.
Inaktivirana homologna cepiva iz aktualnega seva HPAI povzročajo ustrezno zaščito vendar ni možna serološka ločitev med cepljenimi in necepljenimi pticami. Cepivo je narejeno iz aktualnega HPAI virusa, torej obstaja že inherenčna zamuda pred njegovo uporabo na terenu.
Inaktivirana heterologna cepiva je možno uporabiti kot marker cepiva, kadar ima cepilni virus isti HA podtip kot divji virus toda drugačen NA podtip (npr. H5N9 cepivo nasproti, H5N2 HPAI). Z detekcijo NA podtipa specifičnih protiteles je možno razlikovanje cepljenih od okuženih ptic (Cattoli 2003). Vendar znajo biti te metode težavne in so lahko neobčutljive. Ne glede na vse je treba v bankah cepiv imeti cepiva, ki vsebujejo več H5- in H7-podtipov, ki imajo različne NA podtipe. Reverzna genetika bo veliko pomagala v izdelavi cepiv za veterinarsko kot tudi za medicinsko uporabo, tako da bodo le-ta imela željene kombinacije HxNy v ugodnem genetičnem okolju (Liu 2003, Neumann 2003, Subbarao 2003, Lee 2004, Chen 2005, Stech 2005). Sedaj so v uporabi inaktivirana heterologna cepiva v žariščih v jugovzhodni Aziji, v Mehiki, v Pakistanu in v severni Italiji (Garcia 1998, Swayne 2001). Kot alternativa DIV sistemu pri uporabi inaktiviranih cepiv je predložena detekcija NS-1 specifičnih protiteles (Tumpey 2005). Ta protitelesa nastanejo v visokih titrih pri okužbi ptic po naravni poti, toda pri uporabi inaktiviranega cepiva so titri veliko nižji.
Rekombinantna živa z vektorjem narejena cepiva so tista cepiva pri katerih so geni H5 ali H7 HA vtisnjeni v viruse ali v bakterije in so zmožni okužiti perutninske speciese (npr.ptičji pox virus [Beard 1991, Swayne 1997+2000c], virus laringotraheitisa [Lueschow 2001, Veits 2003] ali virus Newcastle bolezni [Swayne 2003] med drugimi). Ker so cepiva živa, je možna masovna aplikacija z vodo ali z razpršilci. Čeprav omogočajo jasno DIVA razlikovanje, bo pre-egsistirajoča imuniteta na vektor virus močno ovirala uspešnost cepljenja. Nekatere izkušnje s terena z rekombinantami ptičjega pox virusa so pridobljene v Mehiki in v ZDA.
Končno je eksperimentalno dokazana uspešna uporaba rekombinantno vtisnjenih HA proteinov in DNA cepljenja z uporabo HA vtisnjenega s plazmidi (Crawford 1999, Kodihalli 1997).
Cepljenje sedaj načrtujejo na nacionalnem nivoju v več državah jugovzhodne Azije (Normile 2005).

Tveganje za pandemijo

Za začetek nove pandemije so nujni trije pogoji:

- pojav najmanj ene generacije virusa gripe HA podtipa v populaciji ljudi, ki se do sedaj ni pojavil (ali ponovni pojav) *in*
- da lahko okuži ljudi in se učinkovito v človeku razmnožuje *in*
- da se brez težav širi in prenaša med ljudmi.

To kaže, da grožnja pojava nove pandemije gripe pri ljudeh ni izključno vezana na pojav HPAI H5N1. Za sedaj H5N1 izpolnjuje le dva od teh pogojev: je novi podtip za večino humane populacije in je okužil in povzročil težko obliko obolenja in visoko letaliteto pri več kot 140 osebah. Pri veliki večini populacije ljudi ni imunitete proti virusom podobnim H5N1. Nova pandemija bi lahko bila na obzorju, če bi azijski rod H5N1 dobil lastnosti za vzdržen in učinkovit prenos s človeka na človeka s postopnim adaptiranjem ali z reasortiranjem z na človeka že adaptiranim virusom (Guan 2004). *In vitro* je že bilo dokazano, da dve sočasni razmenjavi amino kislin na cepitvenih koncih za receptorje v HA proteinu azijskega rodu HPAIV H5N1 (Q226L in

G228S) optimizirata povezovanje na humane receptorje tipa 2-6 več kot so to pri drugih virusih gripe A adaptiranih na človeka (Harvey 2004). Gambaryan in sod. (2006) so že identificirali 2 izolata pri ljudeh (oče in sin okuženi s H5N1 v Hong Kongu l. 2003), ki so za razliko od vseh ostalih izolatov H5N1 izoliranih iz ljudi in iz ptic pokazali večjo afiniteto za receptorje 2-6 zaradi edinstvene mutacije S227N na HA1 receptorskem koncu.
Ta možnost je lahko za naslednjim vogalom ali pa se je že zgodila, ko beremo ta članek. Toda nihče tega ne more reči ali pa napovedati. Možnosti, da se takšen dogodek pojavi so v direktni korelaciji s številom virusov, ki krožijo v perutnini in s tem tveganja eksponiranosti ljudi. Zaradi tega se s H5N1 bojuje na njegovem viru, kar bo zmanjšalo tveganje pandemije, ki ga predstavlja ta virus. V enem e-mailu in na enem debatnem forumu je bilo predlagano, da bi investiranje le 10% denarja, ki je namenjen porabi za razvoj H5 specifičnega cepiva za ljudi, v eradikacijo H5N1 pri perutnini imelo večji učinek, kot bi ga imelo cepljenje ljudi zaradi zaščite pred epidemijo s H5N1.
Od prve izolacije pri človeku l. 1997 H5N1 ni naredil zadnjega koraka k pandemičnosti za humane gostitelje. Najnovejše študije kažejo, da se je vsa ta leta virulenčnost H5N1 za sesalce povečala in se je razširila veriga gostiteljev:

- H5N1 izolirani iz navidezno zdravih domačih rac v kopenskem delu Kitajske od 1999 do 2002, in v Vietnamu od 2003 so progresivno postali bolj patogeni za sesalce (Chen 2004).
- H5N1 je razširil verigo svojih gostiteljev - po naravni poti okuži in ubije sesalske speciese (mačke, tigri), za katere je prej veljalo, da so odporne na okužbo z virusi ptičje gripe (http://www.who.int/csr/don/2004_02_20/en/index.html).

Vendar ne smemo spregledati dejstva, da od začetka dogajanja s H5N1 v Aziji, da se lahko pojavijo tudi drugi virusi gripe, ki imajo mogoče večji pandemični potencial ali pa so se medtem že pojavili. Npr. sevi podtipa H9N2, ki pred 1980-tim ni najden v Aziji, se je ne samo razširil v populacijah azijske perutnine, ampak je učinkovito preskočil v populacijo svinj na jugu in na vzhodu Kitajske (Shortridge 1992, Peiris 2001, Xu 2004). Receptorji teh virusov imajo specifičnosti podobne receptorjem virusov, ki so adaptirani na ljudi (Li 2005b, Matrosovich 2001). Ti H9 virusi imajo širok razpon gostiteljev, ki so genetsko različni in lahko direktno okužijo človeka. Sev H9N2, ki je povzročil okužbe ljudi v Hong Kongu je imel genotip podoben genotipu virusov H5N1 iz l.1997 (Lin 2000).

Zaključek

Pomembnost visoko patogene ptičje gripe (AI) kot uničujoče bolezni perutnine se je v zadnjem desetletju zelo povečala. Uvajanje AI virusov podtipov H5 in H7, ki so nizke patogenosti (LP), iz rezervoarjev divjih vodnih ptic je osnova za ta proces. Ostalo je nepojasnjeno ali in če zakaj se je spremenila tudi prevalenca LP H5 in H7 v njihovih rezervarjih. Upoštevajoč endemsko stanje azijskega rodu HPAI H5N1 pri populacijah domače perutnine v jugovzhodni Aziji, ki povzroča pogoste preskoke v populacije migratornih ptic, kaže, da je neizogiben paradigmatski šift v epizootologiji HPAI v smeri endemičnosti pri populacijah migratornih divjih ptic. To ima lahko težke posledice za perutninsko industrijo v medcelinskih razmerah. Tveganje ekspozicije je povečano za ljudi, ki so direktno povezani s povečano prisotnostjo potencialno zooantroponoznih virusov pri domači perutnini.
Upoštevajoč ptičjo in veterinarsko plat so ostala še številna vprašanja:

1. Ali je azijski rod HPAIV H5N1 že utrdil svoj endemski status v populacijah divjih in migratornih ptic?
2. Ali lahko HPAI virus razvije atenuirani fenotip pri vrstah divjih ptic ob zadrževanju svoje virulenčnosti za perutnino?
3. Ali imajo kopenski sesalci kakšno vlogo v širjenju HPAIV?
4. Ali obstaja genetski del, ki kodira endoproteolitični cepitveni del HA proteina, ki je nagnjen mutacijam le pri podtipih H5 in H7?
5. Kakšen vpliv bi imelo izvajanje masovnega cepljenja perutnine v Aziji proti H5N1 – preprečevanje širjenja virusa ali pospeševanje antigenskega drifta in pobega?

6. Ali spremembe prevalence LPAI podtipov H5 in H7 v njihovih naravnih rezervoarjih potencialno zadevajo tudi evolucijsko stazo-zastoj?

Prvo vprašanje ima glavni pomen ne samo za veterino. Endemičnost azijskega rodu HPAIV H5N1 pri migratornih pticah lahko predstavlja konstantno grožnjo za rejo perutnine. To se lahko doseže le z biovarnostnimi ukrepi, ki zajemajo prepoved reje perutnine na prostem. Alternativa je masovno cepljenje perutnine. Kot drugi pas lahko endemičnost pri divjih pticah povzroči prisotnost HPAI H5N1 virusa v okolju (jezera, obalno morje itd.) in je to lahko še dodatno potencialno tveganje za eksponiranost ljudi. Do sedaj ni bilo prijav prenosa z divjih ptic ali pa iz okolja na ljudi. Vsi prijavljeni okuženi ljudje, vključujoč najnovejše iz Turčije, so izgleda nastali po amplifikaciji virusa in po tesnem kontaktu s hišno perutnino.
Složnost in potencialne posledice sedanjega zooantroponotičnega HPAI H5N1 virusa, ki je semi-pandemičen, pri pticah zahteva usklajeno, modro in natančno delovanje znanstvenikov, politikov in prebivalstva.

Literatura

1. Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. Vet Microbiol 2000; 74: 3-13 Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10799774
2. Allan WH, Alexander DJ, Pomeroy BS, Parsons G. Use of virulence index tests for avian influenza viruses. Avian Dis 1977; 21: 359-63. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=907578
3. 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; [Epub ahead of print] Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16194557
4. Aymard M, Ferraris O, Gerentes L, Jolly J, Kessler N. Neuraminidase assays. Dev Biol (Basel) 2003; 115: 75-83. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15088778
5. Banks J, Speidel ES, Moore E, Plowright L, Piccirillo A, Capua I, Cordioli P, fioretti A, Alexander DJ. Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy. Arch Virol. 2001;146: 963-73. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11448033
6. Bano S, Naeem K, Malik SA. Evaluation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype H9N2 in chicken. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 817-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575070
7. Beard CW, Schnitzlein WM, Tripathy DN. Protection of chicken against highly pathogenic avian influenza virus (H5N2) by recombinant fowlpox viruses. Avian Dis 1991; 35: 356-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1649592
8. Beare AS, Webster RG. Replication of avian influenza viruses in humans. Arch Virol. 1991;119: 37-42. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1863223
9. Beck JR, Swayne DE, Davison S, Casavant S, Gutierrez C. Validation of egg yolk antibody testing as a method to determine influenza status in white leghorn hens. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 1196-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575141
10. Becker WB. The isolation and classification of Tern virus: influenza A-Tern South Africa□1961. J Hyg (Lond) 1966; 64: 309-20. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=5223681
11. Belshe RB. The origins of pandemic influenza--lessons from the 1918 virus. N Engl J Med. 2005; 353: 2209-11.
12. Bridges CB, Lim W, Hu-Primmer J, et al. Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry workers, Hong Kong, 1997-1998. J Infect Dis 2002; 185: 1005-10. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11930308 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v185n8/011256/011256.html

13. Brown IH, Harris PA, McCauley JW, Alexander DJ. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in european pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. J Gen Virol 1998; 79: 2947-2955. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9880008
14. Brown IH, Hill ML, Harris PA, Alexander DJ, McCauley JW. Genetic characterisation of an influenza A virus of unusual subtype (H1N7) isolated from pigs in England. Arch Virol 1997; 142: 1045-50. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9191869
15. Bulaga LL, Garber L, Senne DA, et al. Epidemiologic and surveillance studies on avian influenza in live-bird markets in New York and New Jersey, 2001. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 996-1001. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575100
16. Butt KM, Smith GJ, Chen H, Zhang LJ, Leung YH, Xu KM, Lim W, Webster RG, Yuen KY, Peiris JS, Guan Y. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. J Clin Microbiol. 2005 Nov;43(11):5760-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16272514
17. Capua I, Mutinelli F. Low pathogenicity (LPAI) and highly pathogenic (HPAI) avian influenza in turkeys and chicken. In: Capua I, Mutinelli F. (eds.), A Colour Atlas and Text on Avian Influenza, Papi Editore, Bologna, 2001, pp. 13-20
18. Capua I, Mutinelli F, Marangon S, Alexander DJ. H7N1 avian influenza in Italy (1999-2000) in intensively reared chicken and turkeys. Av Pathol 2000; 29: 537-43
19. Capua I, Marangon S, dalla Pozza M, Terregino C, Cattoli G. Avian influenza in Italy 1997-2001. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 839-43. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575074
20. Cattoli G, Terregino C, Brasola V, Rodriguez JF, Capua I. Development and preliminary validation of an ad hoc N1-N3 discriminatory test for the control of avian influenza in Italy. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 1060-2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575111
21. Cattoli G, Drago A, Maniero S, Toffan A, Bertoli E, Fassina S, Terregino C, Robbi C, Vicenzoni G, Capua I. Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. Avian Pathol 2004; 33: 432-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15370041
22. Cauthen AN, Swayne DE, Schultz-Cherry S, Perdue ML, Suarez DL. Continued circulation in China of highly pathogenic avian influenza viruses encoding the hemagglutinin gene associated with the 1997 H5N1 outbreak in poultry and humans. J Virol 2000; 74: 6592-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10864673 - Full text http://jvi.asm.org/cgi/content/full/74/14/6592
23. Centanni E, Savonuzzi O, cited by Stubbs E.L.: "Fowl plague." Diseases of Poultry. 4th ed.; 1965.
24. Centers for Disease Control (CDC). Interim Guidance for Protection of Persons Involved in U.S. Avian Influenza Outbreak Disease Control and Eradication Activities. Accessed on 28th-Dec-2005: http://www.cdc.gov/flu/avian/pdf/protectionguid.pdf
25. Chen J, Lee KH, Steinhauer DA, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. Cell 1998; 95: 409-17. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9814710
26. Chen H, Deng G, Li Z, et al. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 10452-7. Epub 2004 Jul 2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15235128 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/28/10452
27. Chen H, Smith GJ, Zhang SY, Qin K, Wang J, Li KS, Webster RG, Peiris JS, Guan Y. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. Nature 2005; 436: 191-2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16007072
28. Cheung CY, Poon LL, Lau AS, Luk W, Lau YL, Shortridge KF, Gordon S, Guan Y, Peiris JS. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1)

viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? Lancet 2002; 360: 1831-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12480361

29. Choi YK, Nguyen TD, Ozaki H, Webby RJ, Puthavathana P, Buranathal C, Chaisingh A, Auewarakul P, Hanh NT, Ma SK, Hui PY, Guan Y, Peiris JS, Webster RG. Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Viet Nam and Thailand in 2004. J Virol 2005; 79: 10821-5 16051873
30. Claas EC, Osterhaus AD, van Beek R, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. Lancet 1998; 351: 472-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9482438
31. Collins RA, Ko LS, So KL, Ellis T, Lau LT, Yu AC. Detection of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza subtype H5 (EurAsian lineage) using NASBA. J Virol Methods 2002; 103: 213-25. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12008015
32. Crawford J, Wilkinson B, Vosnesensky A, et al. Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. Vaccine 1999; 17: 2265-74. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10403594
33. Davison S, Ziegler AF, Eckroade RJ. Comparison of an antigen-capture enzyme immunoassay with virus isolation for avian influenza from field samples. Avian Dis. 1998; 42: 791-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9876850
34. Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90: 4171-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8387212 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/reprint/90/9/4171
35. Du Ry van Beest Holle M, Meijer A, Koopmans M, de Jager C. Human-to-human transmission of avian influenza A/H7N7, The Netherlands, 2003. Euro Surveill 2005; 10 [Epub ahead of print]. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16371696
36. Dybkaer K, Munch M, Handberg KJ, Jorgensen PH. Application and evaluation of RT-PCR-ELISA for the nucleoprotein and RT-PCR for detection of low-pathogenic H5 and H7 subtypes of avian influenza virus. J Vet Diagn Invest 2004; 16: 51-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14974847
37. Elbers AR, Kamps B, Koch G. Performance of gross lesions at postmortem for the detection of outbreaks during the avian influenza A virus (H7N7) epidemic in The Netherlands in 2003. Avian Pathol 2004; 33: 418-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15370039
38. Elbers AR, Koch G, Bouma A. Performance of clinical signs in poultry for the detection of outbreaks during the avian influenza A (H7N7) epidemic in The Netherlands in 2003. Avian Pathol 2005; 34: 181-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16191700
39. Feldmann A, Schafer MK, Garten W, Klenk HD. Targeted infection of endothelial cells by avian influenza virus A/FPV/Rostock/34 (H7N1) in chicken embryos. J Virol 2000; 74: 8018-27. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10933711 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/74/17/8018
40. Ferguson NM, Galvani AP, Bush RM. Ecological and immunological determinants of influenza evolution. Nature. 2003; 422: 428-33. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12660783
41. Fouchier RA, Bestebroer TM, Herfst S, Van Der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. J Clin Microbiol 2000; 38: 4096-101. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11060074
42. Fouchier RA, Olsen B, Bestebroer TM, et al. Influenza A virus surveillance in wild birds in Northern Europe in 1999 and 2000. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 857-60. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575077
43. Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Van Doornum GJ, Koch G, Bosman A, Koopmans M, Osterhaus AD. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and

a fatal case of acute respiratory distress syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 1356-61. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14745020 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/5/1356

44. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J Virol 2005; 79: 2814-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15709000
45. Gabriel G, Dauber B, Wolff T, Planz O, Klenk HD, Stech J. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 18590-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16339318
46. Gambaryan AS, Tuzikov AB, Pazynina GV, Webster RG, Matrosovich MN, Bovin NV. H5N1 chicken influenza viruses display a high binding affinity for Neu5Acalpha2-3Galbeta1-4(6-HSO3)GlcNAc-containing receptors. Virology. 2004; 326: 310-6.
47. Gambaryan A, Yamnikova S, Lvov D, et al. Receptor specificity of influenza viruses from birds and mammals: new data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain. Virology 2005; 334: 276-83. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15780877
48. Gambaryan A, Tuzikov A, Pazynina G, Bovin N, Balish A, Klimov A. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. Virology 2006; 344: 432-8. Abstract:

http://amedeo.com/lit.php?id=16226289

49. Garcia M, Crawford JM, Latimer JW, Rivera-Cruz E, Perdue ML. Heterogeneity in the hemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. J Gen Virol 1996; 77: 1493-504. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8757992
50. Garcia A, Johnson H, Srivastava DK, Jayawardene DA, Wehr DR, Webster RG. Efficacy of inactivated H5N2 influenza vaccines against lethal A/Chicken/Queretaro/19/95 infection. Avian Dis 1998; 42: 248-56. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9645315
51. Garman E, Laver G. Controlling influenza by inhibiting the virus's neuraminidase. Curr Drug Targets 2004; 5: 119-36. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15011946
52. Giannecchini S, Campitelli L, Calzoletti L, De Marco MA, Azzi A, Donatelli I. Comparison of in vitro replication features of H7N3 influenza viruses from wild ducks and turkeys: potential implications for interspecies transmission. J Gen Virol 2006; 87: 171-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16361429
53. Gorman OT, Bean WJ, Webster RG. Evolutionary processes in influenza viruses: divergence, rapid evolution, and stasis. Curr Top Microbiol Immunol 1992; 176: 75-97. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1600756
54. Govorkova EA, Rehg JE, Krauss S, Yen HL, Guan Y, Peiris M, Nguyen TM, Hanh TH, Puthavathana P, Long HT, Buranathai C, Lim W, Webster RG, Hoffmann E. Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004. J Virol 2005; 79: 2191-2198. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15681421
55. Guan Y, Peiris JS, Lipatov AS, et al. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. Proc Natl Acad Sci U S A 2002a; 99: 8950-5.. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12077307 - Full text http://www.pnas.org/cgi/content/full/99/13/8950
56. 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: Suppl: 911-3. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575085
57. Guan Y, Peiris M, Kong KF, et al. H5N1 influenza viruses isolated from geese in Southeastern China: evidence for genetic reassortment and interspecies transmission to ducks. Virology 2002b; 292: 16-23. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11878904

58. Guan Y, Poon LL, Cheung CY, Ellis TM, Lim W, Lipatov AS, Chan KH, Sturm-Ramirez KM, Cheung CL, Leung YH, Yuen KY, Webster RG, Peiris JS. H5N1 influenza: a protean pandemic threat. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 8156-61. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15148370 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/21/8156
59. Guo Y, Wang M, Kawaoka Y, Gorman O, Ito T, Saito T, Webster RG. Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China. Virology 1992; 188: 245-55. Abstract:http://amedeo.com/lit.php?id=1314452
60. Haque ME, Koppaka V, Axelsen PH, Lentz BR. Properties and Structures of the Influenza and HIV Fusion Peptides on Lipid Membranes: Implications for a Role in Fusion. Biophys J. 2005; 89:3183-94. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16183890
61. Harvey R, Martin AC, Zambon M, Barclay WS. Restrictions to the adaptation of influenza a virus h5 hemagglutinin to the human host. J Virol. 2004; 78: 502-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14671130 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/78/1/502
62. Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. 2001; Science 293: 1840-1842. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11546875
63. Hayden F, Croisier A. Transmission of avian influenza viruses to and between humans. J Infect Dis 2005;192: 1311-4.
64. Heinen P (2002). Swine influenza: a zoonosis. Vet. Sci. Tomorrow, September 2003. http://www.vetscite.org/publish/articles/000041/print.html
65. Henzler DJ, Kradel DC, Davison S, et al. Epidemiology, production losses, and control measures associated with an outbreak of avian influenza subtype H7N2 in Pennsylvania (1996-98). Avian Dis 2003; 47: Suppl: 1022-36. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575105
66. Herrler G, Hausmann J, Klenk HD. Sialic acid as receptor determinant of ortho- and paramyxoviruses. In: Rosenberg A (ed), Biology of the Sialic Acids, Plenum Press NY, 1995: p. 315-336
67. Hoffmann E, Stech J, Leneva I, et al. Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in southern China: was H6N1 a derivative or a precursor of H5N1? J Virol 2000; 74: 6309-15. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10864640 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/74/14/6309
68. Horimoto T, Nakayama K, Smeekens SP, Kawaoka Y. Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. J Virol 1994; 68: 6074-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8057485 - Full text at http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?pubmedid=8057485
69. Horimoto T, Kawaoka Y. Molecular changes in virulent mutants arising from avirulent avian influenza viruses during replication in 14-day-old embryonated eggs. Virology 1995; 206: 755-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7831837
70. Hulse-Post DJ, Sturm-Ramirez KM, Humberd J, et al. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 10682-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16030144
71. Ito T, Kawaoka Y, Nomura A, Otsuki K. Receptor specificity of influenza A viruses from sea mammals correlates with lung sialyloligosaccharides in these animals. J Vet Med Sci 1999; 61: 955-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10487239
72. Ito T, Okazaki K, Kawaoka Y, Takada A, Webster RG, Kida H (1995). Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. Arch.Virol. 140, 1163-1172. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7646350
73. Ito T, Goto H, Yamamoto E, et al. Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chicken. J Virol 2001; 75: 4439-43. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11287597 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/75/9/4439

74. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. J Virol 1998; 72: 7367-73. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9696833 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/72/9/7367
75. Jin M, Wang G, Zhang R, Zhao S, Li H, Tan Y, Chen H. Development of enzyme-linked immunosorbent assay with nucleoprotein as antigen for detection of antibodies to avian influenza virus. Avian Dis 2004; 48: 870-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15666868
76. Jones YL, Swayne DE. Comparative pathobiology of low and high pathogenicity H7N3 Chilean avian influenza viruses in chicken. Avian Dis 2004; 48: 119-28. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15077805
77. Karasin AI, Brown IH, Carman S, Olsen CW. Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada. J Virol 2000; 74: 9322-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10982381
78. Katz JM, Lim W, Bridges CB, et al. Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts. J Infect Dis 1999; 180: 1763-70. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10558929 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v180n6/990415/990415.html
79. Kawaoka Y, Naeve CW, Webster RG. Is virulence of H5N2 influenza viruses in chicken associated with loss of carbohydrate from the hemagglutinin? Virology 1984; 139: 303-16. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=6516214
80. Kaye D, Pringle CR. Avian influenza viruses and their implication for human health. Clin Infect Dis 2005; 40: 108-12. Epub 2004 Dec 7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15614699
81. Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, et al. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. Emerg Infect Dis 2004; 10: 2189-91. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15663858 - Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol10no12/04-0759.htm
82. Kessler N, Ferraris O, Palmer K, Marsh W, Steel A. Use of the DNA flow-thru chip, a three-dimensional biochip, for typing and subtyping of influenza viruses. J Clin Microbiol. 2004; 42: 2173-85. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15131186
83. Kida H, Ito T, Yasuda J, et al. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. J Gen Virol 1994; 75: 2183-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8077918
84. Kim JA, Ryu SY, Seo SH. Cells in the respiratory and intestinal tracts of chicken have different proportions of both human and avian influenza virus receptors. J Microbiol 2005; 43: 366-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16145552
85. Klenk HD. Infection of the endothelium by influenza viruses. Thromb Haemost 2005 ; 94: 262-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16113814
86. Klempner MS, Shapiro DS. Crossing the species barrier - one small step to man, one giant leap to mankind. N Engl J Med 2004; 350: 1171-2. Epub 2004 Feb 25. http://amedeo.com/lit.php?id=14985471
87. Klopfleisch R, Werner O, Mundt E, Harder T, Teifke JP. Neurotropism of highly pathogenic avian influenza virus A/chicken/Indonesia/2003 (H5N1) in experimentally infected pigeons (*Columbia livia f. domestica*). Vet Pathol 2006; in press
88. Kodihalli S, Haynes JR, Robinson HL, Webster RG. Cross-protection among lethal H5N2 influenza viruses induced by DNA vaccine to the hemagglutinin. J Virol 1997; 71: 3391-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9094608 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/reprint/71/5/3391
89. Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. Lancet 2004; 363: 587-93. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14987882
90. Krauss S, Walker D, Pryor SP, Niles L, Chenghong L, Hinshaw VS, Webster RG. Influenza A viruses of migrating wild aquatic birds in North America. Vector Borne Zoonotic Dis 2004; 4: 177-89. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15631061

91. Kuiken T, Rimmelzwaan G, van Riel D, et al. Avian H5N1 influenza in cats. Science 2004; 306: 241. Epub 2004 Sep 2. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15345779
92. Kwon YK, Joh SJ, Kim MC, Sung HW, Lee YJ, Choi JG, Lee EK, Kim JH. Highly pathogenic avian influenza (H5N1) in the commercial domestic ducks of South Korea. Avian Pathol 2005; 34: 367-70. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16147575
93. Landman WJ, Schrier CC. Avian influenza: eradication from commercial poultry is still not in sight. Tijdschr. Diergeneeskd 2004; 129: 782-96. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15624878
94. Le QM, Kiso M, Someya K, et al. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. Nature 2005; 437: 1108. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16228009
95. Lee CW, Suarez DL. Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. J Virol Methods. 2004; 119: 151-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15158597
96. Lee CW, Swayne DE, Linares JA, Senne DA, Suarez DL. H5N2 avian influenza outbreak in Texas in 2004: the first highly pathogenic strain in the United States in 20 years? J Virol 2005; 79: 11412-21. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16103192
97. Lee CW, Senne DA, Suarez DL. Generation of reassortant influenza vaccines by reverse genetics that allows utilization of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy for the control of avian influenza. Vaccine 2004; 22: 3175-81. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15297071
98. Lee CW, Suarez DL. Avian influenza virus: prospects for prevention and control by vaccination. Anim Health Res Rev. 2005; 6: 1-15. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16164006
99. Lees W. The 2004 outbreak of highly pathogenic avian influenza (H7N3) in British Columbia. Cahnet Bull 2004; 9: 4-10. http://www.cahnet.org/bulletinsE/CahnetBulletin9english.pdf
100. Li J, Chen S, Evans DH. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR. J Clin Microbiol. 2001; 39: 696-704. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11158130
101. Li KS, Xu KM, Peiris JS, et al. Characterization of H9 subtype influenza viruses from the ducks of southern China: a candidate for the next influenza pandemic in humans? J Virol 2003; 77: 6988-94. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12768017 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/77/12/6988
102. Li KS, Guan Y, Wang J, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. Nature 2004; 430: 209-13. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15241415
103. Li SQ, Orlich M, Rott R. Generation of seal influenza virus variants pathogenic for chicken, because of hemagglutinin cleavage site changes. J Virol 1990; 64: 3297-303. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2191148 - Full text at http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?pubmedid=2191148
104. Li C, Yu K, Tian G, Yu D, Liu L, Jing B, Ping J, Chen H. Evolution of H9N2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China. Virology 2005b; 340: 70-83. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16026813
105. Li Z, Chen H, Jiao P, Deng G, Tian G, Li Y, Hoffmann E, Webster RG, Matsuoka Y, Yu K . Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. 2005a; J Virol 79; 12058-12064. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16140781
106. Lin YP, Shaw M, Gregory V, Cameron K, Lim W, Klimov A, Subbarao K, Guan Y, Krauss S, Shortridge K, Webster R, Cox N, Hay A. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97: 9654-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10920197 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/97/17/9654
107. Lipatov AS, Krauss S, Guan Y, et al. Neurovirulence in mice of H5N1 influenza virus genotypes isolated from Hong Kong poultry in 2001. J Virol 2003; 77: 3816-23. Abstract:

http://amedeo.com/lit.php?id=12610156 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/77/6/3816

108. Lipatov AS, Govorkova EA, Webby RJ et al. Influenza: Emergence and control. J Virol 2004; 78: 8951-8959. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15308692 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/78/17/8951

109. Lipatov AS, Andreansky S, Webby RJ, Hulse DJ, Rehg JE, Krauss S, Perez DR, Doherty PC, Webster RG, Sangster MY. Pathogenesis of Hong Kong H5N1 influenza virus NS gene reassortants in mice: the role of cytokines and B- and T-cell responses. J Gen Virol 2005; 86: 1121-30. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15784906 - Full text at http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/full/86/4/1121

110. Liu M, Wood JM, Ellis T, Krauss S, Seiler P, Johnson C, Hoffmann E, Humberd J, Hulse D, Zhang Y, Webster RG, Perez DR. Preparation of a standardized, efficacious agricultural H5N3 vaccine by reverse genetics. Virology. 2003; 314: 580-90. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14554086

111. Liu J, Xiao H, Lei F, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. Science 2005; 309: 1206. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16000410

112. Lu X, Tumpey TM, Morken T, Zaki SR, Cox NJ, Katz JM. A mouse model for the evaluation of pathogenesis and immunity to influenza A (H5N1) viruses isolated from humans. J Virol 1999; 73: 5903-11. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10364342 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/73/7/5903

113. Lu H, Castro AE, Pennick K, Liu J, Yang Q, Dunn P, Weinstock D, Henzler D. Survival of avian influenza virus H7N2 in SPF chickens and their environments. Avian Dis. 2003; 47: 1015-21. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575104

114. Luschow D, Werner O, Mettenleiter TC, Fuchs W. Vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing the hemagglutinin (H5) gene. Vaccine. 2001 Jul 20;19(30):4249-59. http://amedeo.com/lit.php?id=11457552

115. Maines TR, Lu XH, Erb SM, et al. Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals. J Virol 2005; 79: 11788-800. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16140756

116. Mannelli A, Ferre N, Marangon S. Analysis of the 1999-2000 highly pathogenic avian influenza (H7N1) epidemic in the main poultry-production area in northern Italy. Prev Vet Med. 2005 Oct 19; [Epub ahead of print]. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16243405

117. Marangon S, Capua I, Pozza G, Santucci U. field experiences in the control of avian influenza outbreaks in densely populated poultry areas. Dev Biol (Basel) 2004; 119: 155-64. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15742627

118. Marangon S, Capua I. Control of AI in Italy: from "Stamping-out"-strategy to emergency and prophylactic vaccination. In: Proc. Internat. Conf on Avian Influenza, Paris 2005; O.I.E., p. 29.

119. Matrosovich MN, Zhou N, Kawaoka Y, Webster R. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chicken, and wild aquatic birds have distinguishable properties. J Virol. 1999; 73: 1146-55. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9882316 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/73/2/1146

120. Matrosovich MN, Krauss S, Webster RG. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. Virology 2001; 281: 156-62. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11277689

121. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A 2004b; 101: 4620-4. Epub 2004 Mar 15. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15070767 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/13/4620

122. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. J Virol.

2004a; 78: 12665-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15070767 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/101/13/4620

123. Meulemans G, Carlier MC, Gonze M, Petit P. Comparison of hemagglutination-inhibition, agar gel precipitin, and enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibodies against influenza viruses in chicken. Avian Dis 1987; 31: 560-3. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2960313

124. Mo IP, Brugh M, fletcher OJ, Rowland GN, Swayne DE. Comparative pathology of chicken experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. Avian Dis 1997; 41: 125-36. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9087329

125. Mutinelli F, Capua I, Terregino C, Cattoli G. Clinical, gross, and microscopic findings in different avian species naturally infected during the H7N1 low- and high-pathogenicity avian influenza epidemics in Italy during 1999 and 2000. Avian Dis 2003a; 47: Suppl: 844-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575075

126. Mutinelli F, Hablovarid H, Capua I. Avian embryo susceptibility to Italian H7N1 avian influenza viruses belonging to different lineages. Avian Dis 2003b; 47: Suppl: 1145-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575131

127. Nakatani H, Nakamura K, Yamamoto Y, Yamada M, Yamamoto Y. Epidemiology, pathology, and immunohistochemistry of layer hens naturally affected with H5N1 highly pathogenic avian influenza in Japan. Avian Dis 2005; 49: 436-41. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16252503

128. Neumann G, Hatta M, Kawaoka Y. Reverse genetics for the control of avian influenza. Avian Dis. 2003;47(3 Suppl):882-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575081

129. Neumann G, Brownlee GG, Fodor E, Kawaoka Y. Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. Curr Top Microbiol Immunol 2004; 283: 121-43. Abstract:

http://amedeo.com/lit.php?id=15298169

130. Nestorowicz A, Kawaoka Y, Bean WJ, Webster RG. Molecular analysis of the hemagglutinin genes of Australian H7N7 influenza viruses: role of passerine birds in maintenance or transmission? Virology 1987; 160: 411-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3660587

131. Ng EK, Cheng PK, Ng AY, Hoang TL, Lim WW. Influenza A H5N1 detection. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1303-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16102326 - Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no08/04-1317.htm

132. Normile D. Avian influenza. China will attempt largest-ever animal vaccination campaign. Science. 2005; 310: 1256-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16311302

133. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.1.14. Avian influenza. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00037.htm - Accessed 28 December 2005

134. OIE. Terrestrial Animal Health Code. Chapter 2.7.12. Avian influenza. http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_2.7.12.htm - Accessed 28 December 2005

135. OIE 2005 (World Organisation for Animal Health). Highly pathogenic avian influenza in Mongolia: in migratory birds. http://www.oie.int/eng/info/hebdo/ais_55.htm - Accessed 31 octobre 2005.

136. Okazaki K, Takada A, Ito T, et al. Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia. Arch Virol 2000; 145: 885-93. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10881676

137. Olsen CW. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. Virus Res 2002; 85:199-210. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12034486

138. Pasick J, Handel K, Robinson J, et al. Intersegmental recombination between the hemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. J Gen Virol 2005; 86: 727-31. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15722533
139. Payungporn S, Phakdeewirot P, Chutinimitkul S, Theamboonlers A, Keawcharoen J, Oraveerakul K, Amonsin A, Poovorawan Y. Single-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. Viral Immunol 2004; 17: 588-93. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15671756
140. Pearson JE. International standards for the control of avian influenza. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 972-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575096
141. Peiris JS, Guan Y, Markwell D, Ghose P, Webster RG, Shortridge KF. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary 'human' H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? J Virol 2001; 75: 9679-86. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11559800 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/75/20/9679
142. Perez DR, Lim W, Seiler JP, et al. Role of quail in the interspecies transmission of H9 influenza A viruses: molecular changes on HA that correspond to adaptation from ducks to chicken. J Virol 2003; 77: 3148-56. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12584339 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/77/5/3148
143. Perdue ML, Garcia M, Senne D, Fraire M. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. Virus Res 1997; 49: 173-86. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9213392
144. Perdue ML, Suarez DL. Structural features of the avian influenza virus hemagglutinin that influence virulence. Vet Microbiol 2000; 74: 77-86. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10799780
145. Perdue ML. Molecular diagnostics in an insecure world. Avian Dis 2003; 47: 1063-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575112
146. Perkins LE, Swayne DE. Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. Avian Dis 2002a; 46: 53-63. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11924603
147. Perkins LE, Swayne DE. Susceptibility of laughing gulls (*Larus atricilla*) to H5N1 and H5N3 highly pathogenic avian influenza viruses. Avian Dis 2002b; 46: 877-85. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12495048
148. Perkins LE, Swayne DE. Comparative susceptibility of selected avian and mammalian species to a Hong Kong-origin H5N1 high-pathogenicity avian influenza virus. Avian Dis. 2003;47(3 Suppl):956-67. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575094
149. Perroncito CE. [it. Typhoid epizootic in gallinaceous birds.] Epizoozia tifoide nei gallinacei. Torino: Annali Accademia Agricoltura 1878; 21:87-126.
150. Phipps LP, Essen SC, Brown IH. Genetic subtyping of influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region. J Virol Methods 2004;122:119-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15488629
151. ProMED 20050826.2527. Avian influenza H5N1, Civets 2005. Archive number 20050826.2527. Available at http://www.promedmail.org/pls/promed
152. ProMED 20060110.0090. Japan: Mild Avian Influenza Virus Infection Too Risky to Ignore. Archive number 20060110.0090. Available at http://www.promedmail.org/pls/promed
153. Puzelli S, Di Trani L, Fabiani C, et al. Serological analysis of serum samples from humans exposed to avian H7 influenza viruses in Italy between 1999 and 2003. J Infect Dis 2005; 192: 1318-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16170747 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v192n8/34097/34097.html
154. Quirk M. Zoo tigers succumb to avian influenza. Lancet Infect Dis 2004; 4:716. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15593440

155. Rimmelzwaan GF, Kuiken T, van Amerongen G, Bestebroer TM, Fouchier RA, Osterhaus ADME. Pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection in a primate model. J Virol 2001; 77: 3148-3156. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11413336 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/75/14/6687
156. Rogers SO, Starmer WT, Castello JD. Recycling of pathogenic microbes through survival in ice. Med Hypotheses 2004; 63: 773-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15488645
157. Rohm C, Horimoto T, Kawaoka Y, Suss J, Webster RG. Do hemagglutinin genes of highly pathogenic avian influenza viruses constitute unique phylogenetic lineages? Virology 1995; 209: 664-70. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7778300
158. Rott R, Orlich M, Scholtissek C. Correlation of pathogenicity and gene constellation of influenza A viruses. III. Non-pathogenic recombinants derived from highly pathogenic parent strains. J Gen Virol 1979; 44: 471-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=521799
159. Rott R, Klenk HD, Nagai Y, Tashiro M. Influenza viruses, cell enzymes, and pathogenicity. Am J Respir Crit Care Med. 1995; 152: S16-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7551406
160. Rust MJ, Lakadamyali M, Zhang F, Zhuang X. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. Nat Struct Mol Biol 2004; 11: 567-73. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15122347
161. Saito T, Lim W, Suzuki T, et al. Characterization of a human H9N2 influenza virus isolated in Hong Kong. Vaccine 2001; 20: 125-33. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11567756
162. Sala G, Cordioli P, Moreno-Martin A, et al. ELISA test for the detection of influenza H7 antibodies in avian sera. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 1057-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575110
163. Schäfer W. Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und klassischen Geflügelpest. Zeitschr Naturforschung 1955; 10b: 81-91
164. Scholtissek C, Hinshaw VS, Olsen CW. Influenza in pigs and their role as the intermediate host. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ (eds.), Textbook of Influenza, Blackwell Scientific, Oxford, 1998; p 137-145
165. Selleck PW, Lowther SL, Russell GM, Hooper PT. Rapid diagnosis of highly pathogenic avian influenza using pancreatic impression smears. Avian Dis 2003; 47 (3 Suppl): 1190-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575140
166. Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, et al. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. Avian Dis 1996; 40: 425-37. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8790895
167. Seo SH, Goloubeva O, Webby R, Webster RG. Characterization of a porcine lung epithelial cell line suitable for influenza virus studies. J Virol 2001; 75: 9517-25. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11533214 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/75/19/9517
168. Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. 2002; Nat Med 8: 950-954. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12195436
169. Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses. Virus Res 2004; 103: 107-13. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15163498
170. Shafer AL, Katz JB, Eernisse KA. Development and validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of type A influenza antibodies in avian sera. Avian Dis. 1998; 42: 28-34. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9533078
171. Shinya K, Hamm S, Hatta M, Ito H, Ito T, Kawaoka Y. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency but not cell tropism of Hong Kong H5N1 influenza viruses in mice. Virology 2004; 320: 258-266. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15016548

172. Shortridge KF. Pandemic influenza: a zoonosis? Semin Respir Infect 1992; 7: 11-25. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1609163
173. Shortridge KF, Zhou NN, Guan Y, et al. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. Virology. 1998 Dec 20;252(2):331-42. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9878612
174. Sidorenko Y, Reichl U. Structured model of influenza virus replication in MDCK cells. Biotechnol Bioeng 2004; 88: 1-14. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15384040
175. Skehel JJ, Cross K, Steinhauer D, Wiley DC. Influenza fusion peptides. Biochem Soc Trans. 2001; 29: 623-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11498040
176. Smith AW, Skilling DE, Castello JD, Rogers SO. Ice as a reservoir for pathogenic human viruses: specifically, caliciviruses, influenza viruses, and enteroviruses. Med Hypotheses 2004; 63: 560-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15324997
177. Snyder DB, Marquardt WW, Yancey FS, Savage PK. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against avian influenza virus. Avian Dis 1985; 29: 136-44. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3985870
178. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, et al. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. J Clin Microbiol 2002; 40: 3256-60. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12202562
179. Stallknecht DE, Shane SM, Kearney MT, Zwank PJ. Persistence of avian influenza viruses in water. Avian Dis 1990a; 34: 406-11. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2142420
180. Stallknecht DE, Kearney MT, Shane SM, Zwank PJ. Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. Avian Dis 1990b; 34: 412-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2142421
181. Stech J, Garn H, Wegmann M, Wagner R, Klenk HD. A new approach to an influenza live vaccine: modification of the cleavage site of hemagglutinin. 2005; Nat Med 11: 683-689. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15924146
182. Stegeman A, Bouma A, Elbers AR, et al. Avian influenza A virus (H7N7) epidemic in The Netherlands in 2003: course of the epidemic and effectiveness of control measures. J Infect Dis 2004; 190: 2088-95. Epub 2004 Nov 15. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15551206 - Full text at http://www.journals.uchicago.edu/JID/journal/issues/v190n12/32647/32647.html< /A>
183. Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. Virology 1999; 258: 1-20. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10329563
184. Sturm-Ramirez KM, Ellis T, Bousfield B, et al. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. J Virol 2004; 78: 4892-901. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15078970 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/78/9/4892
185. Suarez DL, Schultz-Cherry S. Immunology of avian influenza virus: a review. Dev Comp Immunol. 2000; 24: 269-83. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10717293
186. Suarez DL, Senne DA, Banks J, Brown IH, Essen SC, Lee CW, Manvell RJ, Mathieu-Benson C, Moreno V, Pedersen JC, Panigrahy B, Rojas H, Spackman E, Alexander DJ. Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. Emerg Infect Dis 2004; 10: 693-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15200862 - Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol10no4/03-0396.htm
187. Suarez DL. Overview of avian influenza DIVA test strategies. Biologicals. 2005; 33: 221-6 Epub 2005 Oct 28. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16257543
188. Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE Jr, Chambers TM, Kiso M, Ishida H, Kawaoka Y. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. J Virol 2000; 74:11825-31. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11090182 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/74/24/11825
189. Suzuki Y. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. Biol Pharm Bull 2005; 28: 399-408. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15744059

190. Swayne DE, Suarez DL. Highly pathogenic avian influenza. Rev Sci Tech 2000a; 19: 463-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10935274
191. Swayne DE, Beck JR, Kinney N. Failure of a recombinant fowl poxvirus vaccine containing an avian influenza hemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chicken preimmunized with a fowl pox vaccine. Avian Dis 2000b; 44: 132-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10737653
192. Swayne DE, Beck JR, Mickle TR. Efficacy of recombinant fowl poxvirus vaccine in protecting chicken against a highly pathogenic Mexican-origin H5N2 avian influenza virus. Avian Dis 1997; 41: 910-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9454926
193. Swayne DE, Beck JR, Perdue ML, Beard CW. Efficacy of vaccines in chicken against highly pathogenic Hong Kong H5N1 avian influenza. Avian Dis 2001; 45: 355-65. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11417815
194. Swayne DE, Garcia M, Beck JR, Kinney N, Suarez DL. Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chicken immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert. Vaccine 2000c; 18: 1088-95. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10590330
195. Swayne DE, Suarez DL, Schultz-Cherry S, et al. Recombinant paramyxovirus type 1-avian influenza-H7 virus as a vaccine for protection of chicken against influenza and Newcastle disease. Avian Dis 2003; 47: Suppl: 1047-50. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14575108
196. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. Nature. 2005 Oct 6;437(7060):889-93. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16208372
197. Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R, et al. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. Emerg Infect Dis 2005; 11: 699-701. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15890122 - Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no05/05-0007.htm
198. Tian G, Zhang S, Li Y, Bu Z, Liu P, Zhou J, Li C, Shi J, Yu K, Chen H. Protective efficacy in chicken, geese and ducks of an H5N1-inactivated vaccine developed by reverse genetics. Virology 2005; 341: 153-62. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16084554
199. Tumpey TM, Alvarez R, Swayne DE, Suarez DL. Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus. J Clin Microbiol 2005; 43: 676-83. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15695663
200. van der Goot JA, Koch G, de Jong MC, van Boven M. Quantification of the effect of vaccination on transmission of avian influenza (H7N7) in chickens. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102: 18141-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16330777 - Full text at http://www.pnas.org/cgi/content/full/102/50/18141
201. Veits J, Luschow D, Kindermann K, et al. Deletion of the non-essential UL0 gene of infectious laryngotracheitis (ILT) virus leads to attenuation in chicken, and UL0 mutants expressing influenza virus hemagglutinin (H7) protect against ILT and fowl plague. J Gen Virol 2003; 84: 3343-52. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14645915
202. Wagner R, Matrosovich M, Klenk HD. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. Rev Med Virol 2002; 12: 159-66. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11987141
203. Wagner R, Herwig A, Azzouz N, Klenk HD. Acylation-mediated membrane anchoring of avian influenza virus hemagglutinin is essential for fusion pore formation and virus infectivity. J Virol 2005; 79: 6449-58. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15858028 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/79/10/6449
204. Walker JA, Kawaoka Y. Importance of conserved amino acids at the cleavage site of the haemagglutinin of a virulent avian influenza A virus. J Gen Virol 1993; 74: 311-4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8429306
205. Wan H, Perez DR. Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses. Virology. 2005 Dec 1; [Epub ahead of print]. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16325879

206. Watowich SJ, Skehel JJ, Wiley DC. Crystal structures of influenza virus hemagglutinin in complex with high-affinity receptor analogs. Structure 1994; 2: 719-31. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7994572
207. Webster RG, Yakhno MA, Hinshaw VS, Bean WJ, Murti KG. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. Virology 1978; 84: 268-78. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=23604
208. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev 1992; 56: 152-79. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1579108
209. Webster RG. Influenza: An emerging disease. Emerg Infect Dis 1998; 4: 436-41. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9716966 - Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no3/webster.htm
210. Webster RG, Hulse DJ. Microbial adaptation and change: avian influenza. Rev Sci Tech. 2004; 23: 453-65. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15702713
211. Webster RG, Peiris M, Chen H, Guan Y. H5N1 outbreaks and enzootic influenza. Emerg Infect Dis 2006; 12: 3-8 - Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no01/05-1024.htm
212. Whittaker G, Bui M, Helenius A. The role of nuclear import and export in influenza virus infection. Trends Cell Biol. 1996 Feb;6(2):67-71. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15157497
213. WHO 2004/01/22. Avian influenza H5N1 infection in humans: urgent need to eliminate the animal reservoir. http://www.who.int/csr/don/2004_01_22/en/index.html - Accessed 31 October 2005.
214. WHO 2004/03/02. Avian influenza A(H5N1)- update 31: Situation (poultry) in Asia: need for a long-term response, comparison with previous outbreaks. http://www.who.int/csr/don/2004_03_02/en/index.html - Accessed 31 Octobre 2005.
215. WHO 2004/08/20. Avian influenza: H5N1 detected in pigs in China. http://www.who.int/csr/don/2004_08_20/en/index.html - Accessed 30 October 2005.
216. WHO 2004/10/29. Laboratory study of H5N1 viruses in domestic ducks: main findings. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/labstudy_2004_10_29/en - Accessed 30 October 2005.
217. WHO 2005/08/18. Geographical spread of H5N1 avian influenza in birds - update 28. http://www.who.int/csr/don/2005_08_18/en/index.html - Accessed 31 October 2005.
218. WHO 2005. Avian Influenza: Assessing the pandemic threat. http://www.who.int/csr/disease/influenza/H5N1-9reduit.pdf
219. WHO 2006. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/en
220. WHO Global Influenza Program Surveillance Network. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. Emerg Infect Dis. 2005; 11: 1515-21. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16318689 - Full text at http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no10/05-0644.htm
221. Widjaja L, Krauss SL, Webby RJ, Xie T, Webster RG. Matrix gene of influenza a viruses isolated from wild aquatic birds: ecology and emergence of influenza a viruses. J Virol 2004; 78: 8771-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15280485 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/78/16/8771
222. Witt CJ, Malone JL. A veterinarian's experience of the spring 2004 avian influenza outbreak in Laos. Lancet Infect Dis 2005; 5: 143-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15766647
223. Wood GW, McCauley JW, Bashiruddin JB, Alexander DJ. Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. Arch Virol 1993; 130: 209-17. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8503786
224. Woolcock PR, McFarland MD, Lai S, Chin RP. Enhanced recovery of avian influenza virus isolates by a combination of chicken embryo inoculation methods. Avian Dis 2001; 45: 1030-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11785874

225. Xu X, Subbarao, Cox NJ, Guo Y. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. Virology 1999; 261: 15-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10484749

226. Xu C, Fan W, Wei R, Zhao H (2004). Isolation and identification of swine influenza recombinant A/Swine/Shandong/1/2003 (H9N2) virus. Microbes Infect 6: 919-25. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15310468

227. Yuen KY, Chan PK, Peiris M, et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. Lancet 1998; 351: 467-71. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9482437

228. Zhou N, He S, Zhang T, Zou W, Shu L, Sharp GB, Webster RG. Influenza infection in humans and pigs in southeastern China. Arch Virol. 1996;141(3-4):649-61. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8645101

229. Zhou EM, Chan M, Heckert RA, Riva J, Cantin MF. Evaluation of a competitive ELISA for detection of antibodies against avian influenza virus nucleoprotein. Avian Dis 1998; 42: 517-22. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9777152

230. Zitzow LA, Rowe T, Morken T, Shieh WJ, Zaki S, Katz JM. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. J Virol. 2002; 76: 4420-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11932409 - Full text at http://jvi.asm.org/cgi/content/full/76/9/4420