

# Ptičji grip

Ortrud Werner i [Timm C. Harder](#)

Prevod: Marko Kovačević

## Uvod

([Zeleni linkovi](#): članci sa besplatnim pristupom)

Visokopatogeni ptičji grip je zarazno oboljenje čiji je prvobitni naziv »ptičja kuga«. Prvi put je prepoznato kao zarazno oboljenje ptica i živine v Italiji 1878. godine (Perroncito 1878). Zbog prvog žarišta pojave oboljenja u gornjem toku reke Pad u Padskoj dolini ono je bilo poznato pod nazivom »Lombardijska bolest«. Iako su Centanni i Savonuzzi još 1901. godine prvi identifikovali filtrabilni agens koji je uzročnik oboljenja, to nije bilo priznato sve do 1955. godine kada je Schäfer te uzročnike opisao kao viruse gripa A (Schäfer 1955). U prirodnim rezervoarima domaćini virusa ptičjeg gripa su divlje vodene ptice. Zaraza kod divljih ptica protiče bez ikakvih simptoma, sve dok biotipovi virusa gripa A niske patogenosti koegzistiraju u skoro potpunoj ravnoteži sa svojim domaćinima (Webster 1992, Alexander 2000).

Kada se niskopatogeni sojevi virusa ptičjeg gripa (low pathogenic avian influenza virus, u daljem tekstu LPAIV) prenesu iz svojih domaćina – rezervoara na jako osetljive specijese živine kao što su kokoši i ćurke (to je tzv. transspecijesni korak prenosa!), kod njih prouzrokuju pojavu blagih simptoma. Međutim, u slučajevima kada kod specijesa živine prođe veći broj ciklusa zaraze, kod ovih sojeva dolazi do pojave mutacionih promena koje rezultiraju nastajanjem adaptacije – prilagođavanja na nove domaćine. Virusi gripa A, podtipovi H5 i H7, ne samo da prolaze kroz fazu adaptacije nego imaju i sposobnost skokovitog prelaza u visokopatogeni oblik (high pathogenic avian influenza virus - HPAIV), uzrokuju ga insercione mutacije. Na taj način prouzrokuju teško sistemsko oboljenje koje u kratkom roku vodi u smrt. Ovakvi HPAI virusi mogu nepredvidljivo da nastanu »*de novo*« kod živine koja ja zaražena sa LPAI progenitorima podtipova H5 i H7.

Kod živine HPAI karakteriše iznenadni početak bolesti, težak tok koji traje kratko i smrtnost koja je kod osetljivih vrsta blizu 100%. Pošto HPAI uzrokuje ogromne ekonomske štete u živinskoj industriji, ovo oboljenje pomno prati veterinarska služba. Zbog toga je na svetskom nivou prihvaćeno da je obavezna prijava i same sumnje na ovo oboljenje. Obavezno je i prijavljivanje pojave LPAI koji uzrokuju podtipovi H5 i H7 ([OIE 2005](#)). Pre 1997. godine HPAI je, srećom, bila oboljenje koje se retko pojavljivalo, u svetu su od 1950. g. bile registrovane samo 24 primarne epidemije - epizootije (Tabela 1).

Nedavno je ptičji grip privukao pažnju svetske javnosti kada je visokopatogeni soj podtipa H5N1, (koji je verovatno postojao i pre 1997. godine, a potiče iz južne Kine) dostigao enzootski status kod živine u celoj jugoistočnoj Aziji. On je neočekivano »probio međuklasne barijere« (Perkins i Swayne 2003) kada se sa ptica preneo na sisare (mačke, svinje, ljude). Iako to nije u potpunosti neočekivano (Koopmans 2004, Hayden i Croisier 2005) ipak je izazvao zabrinutost zbog pandemijskog potencijala soja H5N1 (Klempner i Shapiro 2004; [Webster 2006](#)) jer postoji znatan broj dokumentovanih slučajeva obolevanja ljudi koje je pratio težak klinički oblik sa većim brojem smrtnih ishoda. Postoji još dodatnih dokaza, što će biti prikazano u daljem tekstu, koji ukazuju na to da je virus H5N1 dostigao (dobio) patogenost za više vrsta sisara. Ovo je opravdano prouzrokovalo zabrinutost svetske javnosti (Kaye and Pringle 2005).

Tabela 1: Epizootije HPAIV u svetu u prošlosti <sup>1</sup>			
God.	Država/predeo	Zahvaćene domaće ptice	Soj
1959.	Škotska	2 jata pilića (prijavljeno)	A/chicken/Scotland/59 (H5N1)
1963.	Engleska	29.000 gajenih ćurki	A/turkey/England/63 (H7N3)
1966.	Ontario (Kanada)	8.100 gajenih ćurki	A/turkey/Ontario/7732/66 (H5N9)
1976.	Victoria (Australija)	25.000 kokoši nosilja, 17.000 brojlera, 16.000 patki	A/chicken/Victoria/76 (H7N7)
1979.	Nemačka	1 jato sa 600.000 pilića, 80 gusaka	A/chicken/Germany/79 (H7N7)
1979.	Engleska	3 komercijalne farme za gajenje ćurki (nije prijavljen ukupni broj ptica)	A/turkey/England/199/79 (H7N7)
1983. - 1985.	Pennsylvania (SAD)*	17 miliona ptica u 452 jata (većinom pilići ili ćurke, nešto jarebica i gvinejskih kokošiju)	A/chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N2)
1983.	Irska	800 uginulih gradskih ćurki; depopulirano je 8.640 ćurki, 28.020 pilića i 270.000 patki	A/turkey/Ireland/1378/83 (H5N8)
1985.	Viktorija (Australija)	24.000 brojlera, 27.000 kokoši nosilica, 69.000 brojlera, 118.418 pilića (tip nije naveden)	A/chicken/Victoria/85 (H7N7)
1991.	Engleska	8.000 ćurki	A/turkey/England/50-92/91 (H5N1)
1992.	Victoria (Australija)	12.700 brojlera, 5.700 patki	A/chicken/Victoria/1/92 (H7N3)
1994.	Queensland (Australija)	22.000 kokoši nosilja	A/chicken/Queensland/667-6/94 (H7N3)
1994. - 1995.	Meksiko*	Ukupni broj ptica nije poznat, depopulirano je 360 komercijalnih jata kokoši	A/chicken/Puebla/8623-607/94 (H5N2)
1994.	Pakistan*	3,2 miliona brojlera i brojler breeder	A/chicken/Pakistan/447/95 (H7N3)
1997.	Hong Kong (Kina)	1,4 miliona kokošiju i različitih drugih domaćih ptica	A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1)
1997.	New South Wales (Australija)	128.000 brojler breeders, 33.000 brojlera, 261 emu	A/chicken/New South Wales/1651/97 (H7N4)
1997.	Italija	Približno 6.000 kokošiju, ćuraka, gvinejskih kokošiju, pataka, prepelica, golubova, gusaka i jarebica	A/chicken/Italy/330/97 (H5N2)
1999. - 2000.	Italija*	413 farmi, približno 14 miliona ptica	A/turkey/Italy/99 (H7N1)
2002. - 2005.	II Azija*	Kina, Hong Kong, Indonezija, Japan, Kambodža, Laos, Malezija, Koreja, Tajland, Vijetnam, približno 150 miliona ptica	A/chicken/East Asia/2003-2005 (H5N1)
2002.	Čile		A/chicken/Chile/2002 (H7N3)
2003.	Holandija*	Holandija: 255 farmi, 30 miliona ptica; Belgija: 8 farmi, 3 miliona ptica; Nemačka: 1 farma, 80.000 brojlera	A/chicken/Netherlands/2003 (H7N7)
2004.	Kanada (B.C.)*	53 jata, 17 miliona kokoši	A/chicken/Canada-BC/ 2004 (H7N3)
2004.	SAD (TX)	6.600 brojlera	A/chicken/USA-TX/2004 (H5N2)
2004.	Južna Afrika	23.700 ratites (vrste ptica koje ne lete), 5.000 pilića	A/ostrich/S.Africa/2004 (H5N2)

<sup>1</sup> Preuzeto iz Capua i Mutinelli, 2001

\* Epizode epizootija sa značajnim širenjem su na brojnim farmama uzrokovale velike ekonomske gubitke. Većina ostalih epizoda bila je ograničena ili se nisu širile na ostale farme.

## Virusi

Virusi gripa su okruglastog ili izduženog – elipsoidnog oblika, sadrže RNK koja je jednostruko ili višestruko segmentirana i negativnog polariteta. Virusi gripa su iz porodice *Orthomyxoviridae*, a klasifikovani su na tipove A, B ili C na osnovu antigenskih razlika njihovih nukleula i matriksnih proteina. Virusi ptičjeg gripa (AIV) pripadaju tipu A. Nedavno je objavljen izuzetno dobar članak o strukturi i o načinu replikacije virusa gripa (npr. Sidoronko i Reichl 2005).

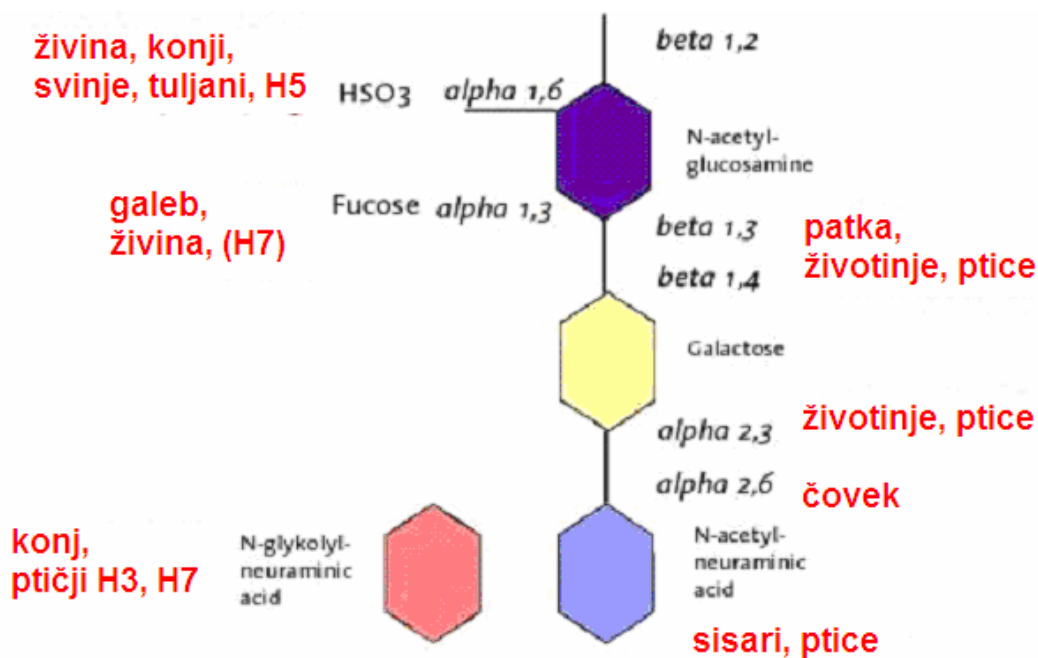
Glavne genetske determinante virusa gripa tipova A i B su hemaglutini (H ili HA) i neuraminidaza (N ili NA), transmembranski glikoproteini koji imaju sposobnost da u organizmu zaraženog prouzrokuju stvaranje za podtip specifične i imune odgovore. Ti imuni odgovori potpuno štite unutar tipova, ali samo delimično štite protiv različitih tipova virusa. Na osnovu antigenosti ovih glikoproteina virusi gripa A su danas razvrstani na 16 H (od H1 do H16) i na 9 N (od N1 do N9) podtipova. Ovakvu klasifikaciju potkrepljuje i izvršena filogenetska analiza nukleotida i razlaganje sekvenci aminokiselina HA i NA gena (Fouchier 2005).

Prilikom označavanja izolovanih virusa gripa po konvenciji je potrebno navesti tip virusa gripa, specijes domaćina (ne navodi se ukoliko je humanog porekla), geografsku lokaciju, serijski broj i godinu izolacije. Za virus gripa tip A u zagradu se dodaju još i podtip hemaglutinina i neuraminidaze. Jedan od roditeljskih sojeva virusa ptičjeg gripa sadašnjih epizootija H5N1 azijske linije izolovan je iz guske u kineskoj provinciji Guangdong. U skladu sa time označen je sa A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1) (Xu 1999). Izolat koji potiče iz prvog dokumentovano obolelog čoveka u azijskoj liniji zaražavanja sa H5N1 iz Hong Konga (Claas 1998) označava se sa: A/HK/156/97 (H5N1).

Hemaglutinin, glikozilirani i acilirani protein, koji se sastoji od 562-566 aminokiselina ugrađen je u ovojnici virusa. Globularna glava njegove membrane - njen spoljašnji deo je pomoću veza pričvršćen za ćelijske receptore. Sastoji se od oligosaharida koji na svojim krajevima imaju derivate neuraminske kiseline (Watowich 1994). Egzodomen – spoljašnji deo drugog transmembranskog glikoproteina - neuraminidaze (NA) koristi sijalolitičku enzimsku aktivnost i oslobađa potomstvo virusa, koje je uhvaćeno na površini zaražene ćelije tokom izlaženja potomstva iz ćelije. Ova funkcija sprečava agregiranje virusa tokom izlaženja, a verovatno da isto tako ubrzava prolaženje virusa kroz slojeve sluzi koji se nalaze na ciljnim ćelijama epitelnog tkiva i ka pričvršćivanju virusa ([Matrosovich 2004a](#)). Ovo je dovelo do toga da neuraminidaza postane zanimljivi cilj za protivvirusne lekove (Garman i Laver 2004). Za procese efikasnog pričvršćivanja, kao i oslobađanja viriona, ključni značaj imaju međusobna usaglašenost i koordinirane aktivnosti antagonističkih glikoproteina vrsta HA i NA (Wagner 2002).

Virioni gripa A pričvršćivanje na spoljašnje proteine ćelije vrše pomoću zrelih trimernih virusnih HA glikoproteina. Pričvršćivanje je slojevito, prati ga prepoznavanje vrsta različitih terminalnih sijalilnih kiselina (N-acetyl- ili N-glykolilneuramininska kiselina), tipa glikozidnih veza sa predzadnjom galaktozom ( $\alpha$ 2-3 ili  $\alpha$ 2-6) i sa sastojcima narednih unutrašnjih fragmenata sijaliloligosaharida koji se nalaze na površini ćelije (Herrler 1995, Gambaryan 2005). Kod različitih domaćina virusa gripa nalaze se različiti sijaliloligosaharidi što se odražava ometanjem pričvršćivanja od strane tkiva ili od strane specijesa. Prilagođavanje virusnog HA i NA glikoproteina na specifične tipove receptora određenih vrsta domaćina preduslov je za efikasno razmnožavanje (Ito 1999, Banks 2001, [Matrosovich 1999+2001](#), [Suzuki 2000](#), Gambaryan 2004). Prilagođavanje obuhvata preoblikovanje jedinica za vezivanje receptora HA proteina i ono nastaje posle interspecijesne transmisije virusa (Gambaryan 2006). Na slici 1 su prikazani različiti mehanički receptori. Virusi ptičjeg gripa

pokazuju najveći afinitet za  $\alpha$ 2-3 spojenu sijaličnu kiselinu jer je to dominirajući tip receptora u epitelnim tkivima u endodermu kod ptica (intestinalni trakt, pluća), što predstavlja ciljeve za te viruse (Gambaryan 2005a, Kim 2005). Za razliku od njih virusi gripa, koji su adaptirani na čoveka, prvenstveno se vežu na 2-6 vezane rezidue koji preovlađuju u necilijarnim epitelnim ćelijama u respiratornim putevima čoveka. Ovakvi receptorski afiniteti delimično su definisani od strane prepreke vrste (specijsna barijera) koja sprečava neograničeni prenos virusa ptičjeg gripa na čoveka (Suzuki 2000, Suzuki 2005). Nedavno je bilo dokazano da u traheji čoveka postoji populacija ćelija cilijarnog epitela koje u manjoj meri sadrže glikokonjugate slične receptorima za ptičji grip (Matrosovitch 2004b), kao i da u manjoj meri i ćelije živine imaju humani tip sijaličnih receptora (Kim 2005). To bi moglo biti objašnjenje za to da ljudi nisu potpuno neosetljivi na zaražavanje sa određenim ptičjim sojevima virusa (Beare i Webster 1991). Kod svinja, a isto tako kod prepelica, u većoj meri su prisutne obe vrste receptora što dovodi do toga da će ove dve vrste biti hipotetičke vreće za mešanje ptičjih i humanih sojeva (Kida 1994, Ito 1998, Scholtissek 1998, Peiris 2001, Perez 2003, Wan i Perez 2005).



Slika 1. Pregled receptorskih afiniteta virusa gripa A (na osnovu podataka Gambaryan 2005)

Kada se virion uspešno pričvrsti za odgovarajući receptor, biće transportovan u endozomni prostor uz pomoć klatrin zavisnih i klatrin nezavisnih mehanizama (Rust 2004). Virus u tom prostoru izbegne degradaciju tako što dođe do spajanja virusne i endozomalne membrane. U ovom procesu posreduje transport protona kroz tunele virusnog matriks-2 (M2) proteina pri pH vrednostima u endozomu oko 5,0; kaskada steričnih promena u proteinima matriksa-1 (M1) i početak oblikovanja homotrimeričnog HA glikoproteinskog kompleksa. Rezultat procesa je razotkrivanje visokoliofilnog fuzogenog domena svakog od HA monomera koji se umeću u endolizozomnu membranu. Time otpočinje fuzija virusne i lizozomne membrane (Hague 2005, Wagner 2005). Rezultat toga je da u citoplazmu prodre 8 virusnih genomskih RNA segmenata koji su u svojem zaštitnom nukleokapsidnom omotaču, a sastoji se od nukleokapsidnih (N) proteina (ribonukleoproteinski kompleks, RNP). U citoplazmi ih virusna mRNA transportuje u jedro na transkripciju i na replikovanje genomske RNA. To je vrlo dobro usklađen proces koji precizno regulišu virusni i ćelijski faktori (Whittaker 1996). RNA-zavisnu RNA polimerazu (RdRp) oblikuju kompleksi virusnih PB1, PB2 i PA proteina. Njima je za to potrebna enkapsidirana RNA (RNPs). Posle prepisivanja virusnih proteina i posle oblikovanja nukleokapsida koje sadrže repliciranu genomsku RNA, novonastali virioni prolaze kroz

ćelijsku ovojnici u koju su se već pre utisnuti virusni glikoproteini. U pravljenu heličnih nukleokapsida i proteina virusne ovojnice posreduje virusni matrični-1 (M1) protein koji oko virusne ovojnice oblikuje strukture slične ljusci. Reprodukcijski ciklus virusa u ćelijama koje u potpunosti dozvoljavaju razmnožavanje vrlo je brza (traje manje od 10 sati). To je vrlo efikasan proces koji je omogućen »optimalnom« prisutnošću gena (Rott 1979, Neumann 2004).

S obzirom da je tokom svoje aktivnosti virusna RdRp sklona greškama utvrđeno je da kod virusa gripa stepen virusnih mutacija iznosi  $\geq 5 \times 10^{-5}$  promena nukleotida na nukleotid i na 1 ciklus replikacije tako da se na jednu replikaciju izmeni približno skoro 1 nukleotid na genom (Drake 1993). U slučaju da u toku replikacije, na nivu domaćina ili na nivou populacije, deluju selektivni pritisci (kao što su neutrališuća antitela, suboptimalno vezanje za receptore ili hemijske antivirusne supstance), mogu da nastanu mutanti koji poseduju odgovarajuće prednosti. Oni zbog toga postaju dominantni unutar virusnog kvazispicijesa u samom domaćinu ili u populaciji. Mutanti sa odgovarajućim selektivnim prednostima (npr. izbegavanje neutralizacije, preoblikovanje jedinica za vezivanje za receptore) mogu da se izdiferenciraju i da postanu dominantne varijante. Ukoliko su napadnute antigenske determinante za membranske glikoproteine HA i NA, i to mehanizmima imuniteta, ovaj postupni proces naziva se *antigenski drift* (mala antigenska promena) (Fergusson 2003).

*Antigenski shift* (velika antigenska promena) označava iznenadno i temeljito menjanje antigenskih determinanti, tj. menjanje H i/ili N podtipa unutar jednog samog ciklusa replikacije. To se dogodi u ćeliji koja je istovremeno zaražena sa dva ili sa više podtipova virusa gripa. Raspodela repliciranih virusnih genomskih segmenata u buduće virusno potomstvo javlja se nezavisno od podtipa virusa svakog segmenta, tako da nastaje potomstvo koje je kompetentno za replikaciju i koje u sebi nosi genetske informacije različitih roditeljskih virusa (tzv. reasortanti- potomci sa preraspoređenim genima) (Webster i Hulse 2004, WHO 2005). Iako su pandemijski humani virusi gripa iz 1957. (H2N2) i iz 1968.g. (H3N2) nesumnjivo nastali reasortiranjem između humanih i ptičjih virusa, virus koji je prouzrokovao »Španski grip« 1918. godine izgleda da je u potpunosti ptičjeg porekla – izvora (Belshe 2005).

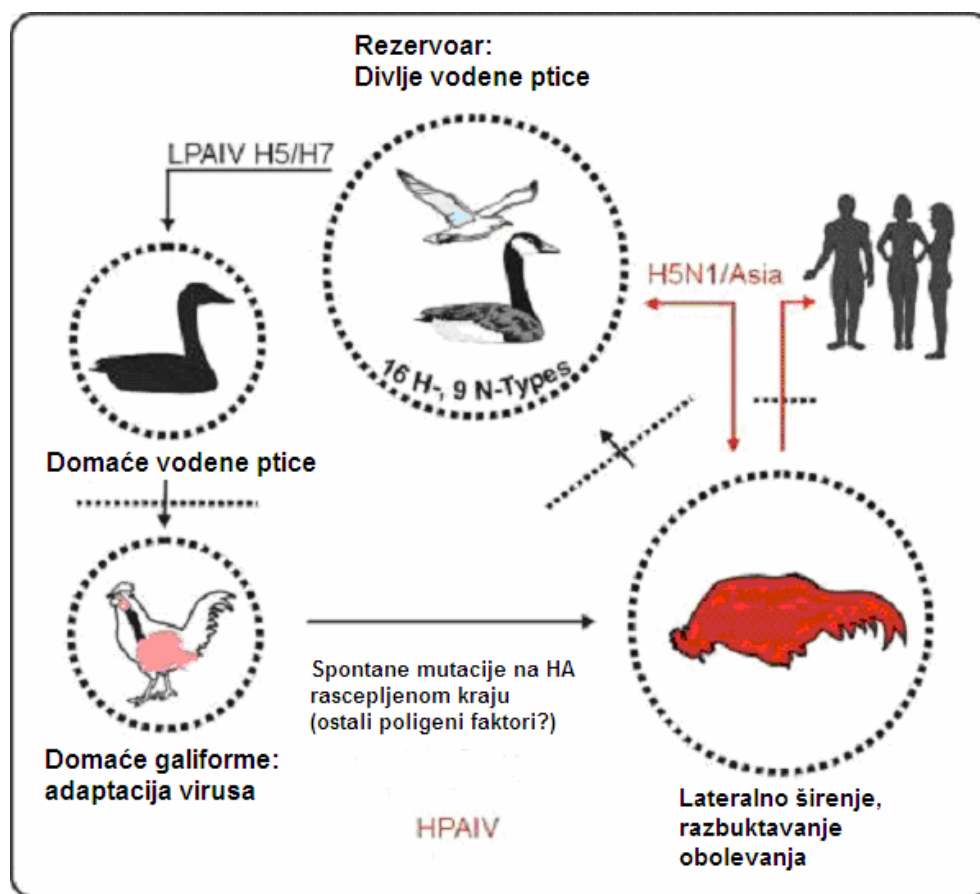
## Prirodni domaćini

Nosioci niza različitih virusa gripa podtipa A su divlje vodene ptice, posebno pripadnice reda *Anseriformes* (patke i guske) i *Charadriiformes* (galebovi i obalske ptice) su nosioci različitih vrsta virusa gripa podtipa A i najverovatnije predstavljaju prirodni rezervoar svih virusa gripa A (Webster 1992, Fouchier 2003, Krauss 2004, Widjaja 2004). Iako se misli da su sve vrste ptica osetljive, poznato je da su neke vrste domaće živine - kokoši, ćurke, biserke, prepelice i fazani - posebno osetljive na posledice zaraze.

Virusi ptičjeg gripa tipa A kod svojih prirodnih domaćina obično ne prouzrokuju obolevanje. Umesto toga oni ostaju u evolucionoj stazi (zastoju), što se na molekularnom nivou utvrđuje niskim koeficijentom *N/S* (ne-sinonimni vs. sinonimni) mutacija. To ukazuje na čistu evoluciju (Gorman 1992, Taubenberger 2005). Domaćini i virus koegzistiraju u vrlo dobro uravnoteženoj toleranciji što se klinički izražava odsutnošću bolesti i efikasnom replikacijom virusa. Pri tome domaćin izmetom izlučuje ogromne količine virusa, do  $10^{8.7} \times 50\%$  infektivne doze za jaje, ( $EID_{50}$ ), na 1 gram izmeta (Webster 1978). Kada se virus prenese na jako osetljive specijese živine, obično se pojave blagi simptomi oboljenja ili ih uopšte nema. Virus ovog fenotipa nazvani su niskopatogeni (LPAIV) i uglavnom uzrokuju blago prolazno smanjenje nošenja jaja kod nosilica ili blago smanjenje telesne težine kod tovljene živine (Capua i Mutinelli 2001). Međutim, podtipovi H5 i H7 imaju potencijal za mutiranje u visokopatogeni oblik *posle prenosa* i posle adaptacije na nove živinske domaćine. Pojavljivanje visokopatogenih oblika H5 i H7 ili drugih podtipova nije nikada bilo utvrđeno kod divljih ptica (Webster 1998). Zbog toga bi se moglo pomisliti da su visokopatogeni oblici nešto veštačko i da što je to moguće rezultat mešanja čoveka u prirodno uravnoteženi

sistem.

Kada jednom kod domaće živine nastanu fenotipovi HPAIV, oni imaju sposobnost da se prenose horizontalno sa živine nazad na populaciju divljih ptica. Osetljivost divljih ptica na obolevanje koje uzrokuje HPAIV je vrlo različita i varira od vrste do vrste, u zavisnosti od starosti i od soja virusa. Do pojave azijskog roda H5N1 HPAI virusa vraćanje HPAIV u populaciju divljih ptica se javljalo sporadično i bilo je ograničeno (uz jedan izuzetak – pomor čigri u Južnoj Africi 1961. godine [Becker 1966]), tako da divljim pticama u širenju HPAIV nije ni bila pripisivana epidemiološki značajna funkcija (Swayne i Suarez 2000). Početkom 2005. g. to se iz osnova promenilo kada je došlo do pojave velike epizootije kod hiljada divjih ptica u prirodnom rezervatu na jezeru Quinhgai na severozapadu Kine koja je povezana sa azijskim rodnom H5N1- HPAI (Chen 2005, Liu 2005). Kao rezultat toga utvrđena je mogućnost daljeg širenja ovog virusa u pravcu Evrope ([OIE 2005](#)). Detalji i posledice su opisani u daljem tekstu.



Slika 2. Shema patogeneze i epidemiologije ptičjeg gripa

LPAIV – niskopatogeni virus ptičjeg gripa; HPAIV – viskopatogeni virus ptičjeg gripa; HA – protein hemaglutin protein; tačkaste crte sa strelicama predstavljaju specijesne barijere

## Patogeneza HPAI

Patogenost je, kao opšta osobina virusa gripa, poligenička osobina koja između ostalog zavisi od »optimalne« genske konstelacije napadnutog domaćina i od tkivnog tropizma, od efikasnosti replikacije i od imunih mehanizama izbegavanja. Poreg toga, specifični faktori domaćina i specifični faktori vrste doprinose ishodu zaraze, a to je po interspecijesnom prenosu *a priori* nepredvidljivo. Viskopatogene oblike ptičjeg gripa su do sada prouzrokovali samo virusi gripa A podtipova H5 i H7. Međutim, postoji samo nekoliko predstavnika

podtipova H5 i H7 koji su visokopatogeni biotipovi (Swayne i Suarez 2000). Obično se virusi H5 i H7 kod svojih domaćina stabilno održavaju kao niskopatogeni oblici. Iz ovih rezervoara virusi mogu da se prenose preko različitih puteva na jata živine (vidi dalje). Posle različitog, i za sada neutvrđenog perioda cirkulacije (i verovatno adaptacije) u osetljivim populacijama živine ovi virusi mogu skokovito da mutiraju u visokopatogeni oblik (Rohm 1995).

Studije redosleda nukleotida su pokazale da većina HPAIV imaju zajedničke karakteristike njihovih HA gena koji kod živine služe kao marker virulentnosti (Webster 1992, Senne 1996, Perdue 1997, Steinhauer 1999, Perdue i Suarez 2000).

Da bi postali infektivni virioni gripa A moraju da uključe HA proteine koji su bili obrađeni endoproteolitički iz prekursora HA<sub>0</sub> do dimera HA<sub>1,2</sub> sa disulfidnom vezom (Chen 1998). Novonastali N-terminus HA<sub>2</sub> podjedinice sadrži fuzogeni peptid koji je sastavljen od jako lipofilnog domena (Skehel 2001). Taj domen ima životni značaj tokom procesa združivanja virusne i lipozomne membrane jer on otpočinje proces prodiranja virusnih genomskih segmenata u citoplazmu ćelije domaćina. Rascepljeni kraj HA niskopatogenih virusa je sastavljen od dve bazične aminokiseline na pozicijama -1/-4 (H5) i -1/-3 (H7) (Wood 1993). Ovi su krajevi dostupni su za tkivno specifične proteaze koje su slične tripsinu i većinom se nalaze na spoljašnjoj strani respiratornog i gastrointestinalnog epitela. Zbog toga je verovatno kod prirodnih domaćina u velikoj meri ograničena efikasna replikacija LPAIV-a samo na te krajeve. Suprotno tome, rascepljeni kraj virusa HPAI obično sadrži još dodatne osnovne aminokiseline (arginin i/ili lizin) koje učine da je podložan obradi od strane subtilizin-sličnim endoproteazama koje su specifične za minimalni saglasni niz -R-X-K/R-R- (Horimoto 1994, Rott 1995). Proteaze ove vrste (npr. furin, proprotein-konvertaze) aktivne su u skoro svakom tkivu u celom organizmu. Zbog toga virusi koji nose takve mutacije imaju prednost za neograničenu replikaciju na sistemski način. Ovaj proces je više bio dokumentovan na terenu. U Italiji je npr. LPAI H7N1 virus više meseci kružio u populacijama ćuraka i kokošiju pre nego što je decembra 1999. neočekivano nastao HPAI H7N1 koji se od svog prekursora razlikovao samo po polibazičnom rascepljenom kraju i prouzrokovao je razorno oboljenje (Capua 2000).

Pretpostavljalo se da HA geni podtipova H5 i H7 sadrže posebne sekundarne strukture RNA koje podržavaju insercione mutacije (kodon duplikacije) pomoću rekopiranja jedinice virusne polimeraze na purinskom kraju i da kodiraju endoproteolitički rascepljeni kraj ovih HA proteina (Garcia 1996, Perdue 1997). Ovaj, i verovatno još i drugi mehanizmi, kao što je supstitucija nukleotida ili intersegmentne rekombinacije (Suarez 2004, Pasick 2005), mogu da prouzrokuju ugradnju dodatnih bazičnih aminokiselinskih ostataka. Ovo poslednje je bilo eksperimentalno dokazano pomoću generisanja HPAIV iz prekursora LPAIV koji je nastao ponavljanjem pasažiranjem *in vivo*, uz pomoć položajno usmeravane mutageneze (Li 1990, Walker i Kawaoka 1993, Horimoto i Kawaoka 1995, Ito 2001). Suprotno tome, odstranjivanje polibazičnog rascepljenog kraja pomoću reverzne genetike atenuira HPAI fenotip (Tian 2005).

Ipak, postoje i sojevi virusa kod kojih se kodiranje redosleda nukleotida HA rascepljenog kraja feno-/patotipa ne slaže na predviđeni način: čileanski H7N3 HPAIV koji je nastao pomoću intersegmentne rekombinacije otkrivenih bazičnih aminokiselinskih rezidua samo na na pozicijama -1, -4 i -6 (Suarez 2004). Slični primeri postoje i kod roda H5 (Kawaoka 1984). Sa druge strane je izolat H5N2 iz Teksasa pokazao da sadrži saglasni niz za rascepljeni niz, ali je klinički klasifikovan kao LPAI (Lee 2005). Ovi podaci ponovo naglašavaju poligenisku i komplikovanu patogenost virusa gripa.

Srećom, izgleda da je rađanje fenotipova HPAI na terenu ipak redak slučaj. Tokom poslednjih 50 godina bile su zabeležene samo 24 primarne epizootije koje je prouzrokovao HPAI koji verovatno *de novo* na ovakav način takođe nastaje i na terenu (Tabela 1).

Pored svega pokazano je da je HPAIV sposoban da zarazi sisare i posebno ljude. To je posebno utvrđeno za azijski rod H5N1 (WHO 2006). Patogenost HPAIV H5N1 zavisnu od domaćina su za sisare proučavali na većem broju modela: miševi (Lu 1999, Li 2005a), vretne - beli tvorovi (Zitzow 2002, Govorkova 2005), majmuni cynomolgous (Rimmelzwaan 2001) i svinje (Choi 2005). Pokazalo se da ishod zaraze zavisi od soja virusa i od vrste (specijes)

domaćina. Vretne-beli tvorovi izgleda da kao u ogledalu odražavaju patogenost kod čoveka, bolje nego miševi (Maines 2005).

Izgleda da u patogenosti učestvuju brojni genetski markeri koji su locirani u različitim segmentima Z genotipa H5N1 (Tabela 2). Među njima su mehanizmi interferencije sa mehanizmima linije odbrane domaćina, kao što je sistem interferona, preko produkata NS-1 gena, koji su postali posebno zanimljivi. Pomoću reverzne genetike eksperimentalno je dokazano da su NS-1 proteini nekih sojeva H5N1, koji imaju glutaminsku kiselinu na poziciji 92, u stanju da prouzrokuju protivvirusne efekte interferona i  $\alpha$ -faktora tumorske nekroze. To verovatno prouzrokuje smanjenje replikacije u domaćinu i do smanjivanja pražnjenja-izlaska iz zaraženog domaćina (Seo 2002+2004). Pored toga oštećenja nastala usled imunih reakcija zbog sa NS-1 posredovanim prekidanjem mreže citokina moguće je delom pripisati oštećenjima pluća (Cheung 2002, [Lipatov 2005](#)). Međutim ni jedna od tih mutacija (Tabela 2) sama ne predstavlja stvarni preduslov za patogenost za sisare ([Lipatov 2003](#)). Zbog toga izgleda da kod sisara u velikoj meri na patotipske specifičnosti utiče i njima upravljaju optimalna konstelacija gena na način koji je zavisen od domaćina ([Lipatov 2004](#)).

Tabela 2. Pregled genomskih lokusa koji bi mogli biti upleteni u povećanu patogenost za sisare kod virusa visokopatogenog azijskog roda H5N1			
Gen, Protein	Mutacija	Učinci	Referenca
HA	polibazični endo-proteolitički rascepljeni kraj	prednosti za sistemsku diseminaciju i replikaciju (živina, sisari)	razne
NA	19-25 aa delecija u regionu stabla	adaptacija na razvoj u živini i u ćurkama (?)	<a href="#">Matrosovich 1999</a> , <a href="#">Giannecchini 2006</a>
PB2	627K	izmenjena sistemska replikacija u miševima	Hatta 2001, Shinya 2004
	701N	povećana patogenost na miševima	Li 2005
PB-1	13P, 678N	izmenjena aktivnost polimeraze; što je korisno za rani proces specijes-specifične adaptacije?	Gabriel 2005
NP	319K		
NS-1	92E	olakšano izmicanje urođenim imunim odgovorima, kod svinja smanjeno pražnjenje virusa	Seo 2004

## Klinička slika

Po isteku perioda inkubacije, koji obično traje nekoliko dana (retko više od 20 dana) zavisno od osobina izolata, od inokulacione doze, od specijesa i od starosti ptice, kod ptica se razvija različita klinička slika ptičjeg gripa. Simptomi su nespecifični (Elbers 2005). Zbog toga je nemoguće dijagnozu bolesti bazirati samo na osnovu kliničke slike.

Simptomi koji se pojave posle zaražavanja niskopatogenim AIV mogu da budu vrlo diskretni: nakostrešeno perje, privremeno smanjenje broja snesenih jaja ili gubitak telesne težine zajedno sa blagim respiratornim oboljenjem (Capua i Mutinelli 2001). Neki LP sojevi, kao što je azijski rod H9N2, koji su prilagođeni na efikasnu replikaciju kod živine mogu da prouzrokuju vidne znake bolesti i, takođe, značajni mortalitet (Bano 2003, Li 2005).

U svom visokopatogenom obliku bolest se kod kokošiju i kod ćuraka može pojaviti iznenada već u roku 48 sati, praćena je teškim simptomima i mortalitetom koji je blizu 100% već u prvih 48 sati (Swayne i Suarez 2000). Širenje unutar zahvaćenog jata zavisi od načina

uzgoja: u jatima koja su na stelji moguć je direktni kontakt i mešanje životinja, zaraza se brže širi nego u uslovima uzgoja u kavezima, ali je ipak dovoljno samo nekoliko dana da se sve životinje zaraze (Capua 2000). Često je zahvaćen samo deo farme. Brojne ptice uginu bez da pokažu bilo kakve prethodne znake, tako da se ponekad posumnja na trovanje (Nakatani 2005). Treba napomenuti da neki izolati HPAI virusa mogu da prouzrokuju teško oboljenje samo kod jedne vrste ptica, dok kod drugih ne: na pijacama žive živine u Hong Kongu godine 1997. pre potpune depopulacije, HPAIV H5N1 je imalo 20% kokošiju i samo 2,5% patki i ćurki, dok su ostale galiforme, vrapci i papagajske vrste bile negativne. Klinički izraženo oboljenje su imale samo kokoši (Shortridge 1998).

U industrijskom načinu uzgoja živine naglom porastu konzumacije vode i hrane, sledi progresivno opadanje konzumiranja, što može da bude znak za prisutnost oboljenja u jatu. U jatima nosilja je uočljiv prekid nošenja jaja. Pojedine ptice pogođene sa HPAI često pokazuju tešku apatiju i nemobilnost (Kwon 2005). Uočljivi su edemi na delovima glave koji nisu pokriveni perjem, cijanoza kreste, podbratka i na nogama, dolazi do proliva sa izmetom zelenkaste boje i otežano disanje. Kod nosilja se na početku pojave jaja sa mekom ljuskom, sa napredovanjem bolesti brzo dolazi do prekida nošenja jaja (Elbers 2005). Znaci od strane nervnog sistema obuhvataju tremor, neuobičajno držanje (torticolis) i otežnu koordinaciju (ataxia) koji preovlađuju kod manje osetljivih specijesa, kao što su patke, guske i ratites - ptice koje ne lete (Kwon 2005). U toku epizootije HPAI u Saksonji, Nemačka, 1979, guske su prisilno plivale u pravilnim krugovima i to je bio jedan od znakova koji je doveo do sumnje na HPAI.

Klinička slika zaraze čoveka ptičjim gripom je opisana u poglavlju pod naslovom »Klinička slika gripa čoveka«.

## Patologija

### LPAI

Lezije su različite u zavisnosti od soja virusa, vrste domaćina i od starosti. Uopšte, jedino kod ćurki i kokošiju postoje očite i mikroskopske promene, posebno pri zarazi sojevima koji su adaptirani na ove domaćine (Capua i Mutinelli 2001). Kod ćuraka su bili dijagnostikovani sinusitis, traheitis i sakulitis iako su moguće i sekundarne bakterijske infekcije. Kod ćuraka je opisan pankreatitis, a kod kokošiju najčešće nalazimo zahvaćenost respiratornog trakta u lakšem obliku. Pored toga se kod nosilja lezije nalaze na organima za reprodukciju (ovarijumi, jajovod, žumančani peritonitis).

### HPAI

Makroskopske patološke i histopatološke promene HPAI pokazuju sličnu zavisnost opisanu kod kliničke slike. Navode se četiri vrste patoloških promena (Perkins i Swayne 2003):

(i) perakutne (unutar 24-36 časova posle infekcije, većinom kod nekih galiformnih specijesa) i akutne oblike oboljenja koji ne pokazuju karakteristične makroskopske patološke promene: diskretni hidroperikardijum, blagi edem intestinalnog trakta i ponekada petehijalna krvarenja na mezenterijalnoj i perikradijalnoj serozi koje se ne opisuju uvek (Mutinelli 2003a, Jones i Swayne 2004). Kokoške koje su bile inficirane rodnom azijskog H5N1 povremeno su imale u traheji hemoragične tragove i znatnu količinu sluzi (Elbers 2004). Isto tako je moguće naći serozne eksudate u telesnim šupljinama i plućni edem. Tačkasta krvarenja u sluznici proventrikula, koja su u prošlosti bila često opisivana u udžbenicima javljala su se izuzetno i samo kod živine inficirane rodnom azijskog H5N1 (Elbers 2004). U različitim organima moguće je naći različite histološke lezije zajedno sa virusnim antigenom (Mo 1997). Virus je prvi put viđen u endotelijalnim ćelijama. Kasnije su ćelije koje su zaražene virusom našli miokardu, u nadbubrežnim žlezdama i u pankreasu. Zaraze se i neuroni kao i glijalne ćelije mozga. Patogenetski tok je sličan toku zaraze prouzrokovane ostalim endoteliotrofnim virusima, gde aktivacija endotelijalnih ćelija i leukocita vodi sistemskom i nekoordinisanom oslobađanju citoksina, što dovodi do sklonosti kardiopulmonarnom ili multiorganskom propadanju

([Feldmann 2000](#), Klenk 2005);

(ii) kod životinja kod kojih je početak simptoma razvučen i imaju produženi tok bolesti u kliničkoj slici bolesti preovlađuju neurološki simptomi, a histološki se vide nesupurativna oštećenja mozga (Perkins i Swayne 2002a, Kwon 2005). Međutim virus je moguće izolovati i iz drugih organa. Ovakav tok oboljenja je opisan kod gusaka, patki, emua i kod drugih specijesa koji su bili eksperimentalno zaraženi rodnom azijskoga HPAI H5N1 soja. Kod ptica koje nesu jaja moguće je utvrditi zapaljenje ovarijuma i jajovoda posle rupture folikula, tzv. žumančani peritonitis.

(iii) kod patki, galebova i kod kućnih vrabaca utvrđena je samo ograničena replikacija virusa. Te ptice su pokazivale blagi oblik intersticijalne pneumonije, alveolitis i povremeno limfocitni i histiocitni miokarditis (Perkins i Swayne 2002a, 2003).

(iv) u eksperimentima koje su izvodili Perkins i Swayne (2003) golubovi i čvorci su se pokazali kao otporni na zarazu sa H5N1. Međutim Werner i sar. (biće objavljeno) su uspeli da kod 5/16 golubova prouzrokuju dugotrajno neurološko oboljenje uzrokovano nesupurativnim encefalitisom (Klopfleisch 2006). Koristili su nedavni HPAI izolat iz Indonezije H5N1.

## Diferencijalna dijagnoza

U diferencijalnoj dijagnostici HPAI treba uzeti u obzir oboljenja koja imaju iznenadni početak, prati ih visoki mortalitet ili hemostaza podbratka i kreste:

- velogenička Newcastle bolest
- infektivni laringotraheitis (kokoši)
- pačja kuga
- akutna trovanja
- akutna kolera kokošiju (Pasteurellosis) i druga septikemijska oboljenja
- bakterijski celulitis podbratka i kreste

Oblici HPAI koji imaju lakši tok još više klinički zbunjuju. Zbog toga je za sve dalje mere koje bi trebalo preduzeti od ključnog značaja brza laboratorijska dijagnostika (Elbers 2005).

## Laboratorijska dijagnoza

### Skupljanje uzoraka

Uzorke treba uzeti sa većeg broja kadavera, kao i od obolelih ptica u jatu. Idealno je uzimanje uzoraka na statističkoj bazi kao i postavljanje dijagnoze na osnovu jata. Kada se uzimaju uzorci od ptica koje su sumljive na HPAI, treba voditi računa o sprovođenju mera zaštite kod lica koja vrše uzorkovanje zbog potencijalno zooantopozne HPAIV ([Bridges 2002](#)). Uputstva je dao [CDC 2005](#).

Za virusološke analize treba uzeti bris kloake i bris orofarinksa. To u principu omogućava laboratorijsku obradu uzoraka. Uzete briseve treba promešati u 2-3 ml sterilnoj transportnoj hranljivoj podlozi koja sadrži antibiotike i proteine (npr. 0,5 % [w/v] bovini serum albumin, do 10% bovinog seruma ili brain-heart infusion).

Na autopsiji koja se vrši uz upotrebu zaštitne opreme autopsijskog osoblja uz sprovođenje mera za sprečavanje širenja oboljenja se za izolaciju virusa, uzimaju uzorci mozga, pluća, slezine i sadržaja creva.

Za serološke reakcije od životinja se uzimaju uzorci krvi. Broj sakupljenih uzoraka mora biti toliki da se omogući detekcija sa 95% intervalom poverenja za parametar sa 30% prevalencijom.

### Transport uzoraka

Brisevi, tkiva i krv se transportuju na hladnom, ali ne smeju da se zamrznu. Ukoliko se očekuje da će transport trajati više od 48 časova, u tom slučaju uzorke treba zamrznuti i takve ih transportovati u suvom ledu. Tokom transportovanja uzoraka mora voditi računa o sprovođenju bezbednog transporta in mora se se kontrolisati sprovođenje propisa za

bezbedan transport istih (e.g. IATA pravila) čime se sprečava širenje oboljenja i akcidentalno zaražavanje ljudstva tokom transporta. Pre slanja uzoraka treba o pripremi i slanju obavestiti laboratoriju, još bolje je obavestiti je pre pristupanja uzimanju uzoraka.

## Dijagnostički postupci

### Direktna detekcija AIV infekcije

U suštini postoje dva (paralelna) smera dijagnostičkih postupaka kojima se pokušava (i) izolacija i suptipizacija virusa pomoću klasičnih metoda (vidi [OIE Manual 2005](#)) i (ii) molekularno otkrivanje i detaljno opisivanje genoma virusa.

(i) Obično se izolacija virusa AI vrši inokulacijom rastvora brisa ili homogenata tkiva u 9 - 11 dana stara embrionisana kokošija jaja većinom kroz horioalantoičku vreću (Woolcock 2001). U zavisnosti od patološkog tipa virusa, embrioni mogu da uginu ili da prežive u toku petodnevnog posmatranja. Obično ne postoje nikakve značajnije lezije ni na embrionu ni na alantoičnoj membrani (Mutinelli 2003b). Jaja u koja je inokulisan materijal koji sadrži HPAIV obično uginu unutar 48 sati. U prikupljenoj alantoičnoj tečnosti moguće je otkriti prisustvo hemaglutinacijske materije. Hemaglutinacija (HA) je neosetljiva tehnika za koju je potrebno prisustvo najmanje  $10^{6.0}$  delova na ml. Ukoliko je u inokulumu prisutna mala koncentracija virusa, kod nekih sojeva LPAIV je potrebno izvršiti najmanje dve dodatne pasaže u embrioniranim jajima da se dobije dovoljan broj virusa koje je moguće otkriti pomoću HA. U slučaju HPAIV, dostizanje optimalne hemaglutinacije potrebna je druga pasaža uz upotrebu razređenog inokuluma.

Hemaglutinacioni izolati se antigenski karakterišu pomoću testova inhibicije hemaglutinacije (HI) uz korišćenje (mono-) specifičnih antiseruma za 16 H podtipova i za kontrolu za različite tipove ptičjih paramiksovirusa koji takođe imaju hemaglutinacijsku aktivnost. Podtip NA je moguće utvrditi pomoću reakcija inhibicije neuraminidaze. Za to su potrebni podtip specifični serumi (Aymard 2003). U slučaju susreta sa izolatima iz rodova H5 ili H7 za njih je potrebno utvrditi intravenski indeks patogenosti (IVPI), s čime se razlikuju LP i HP biotipovi (Allan 1977). Virus koji je izolovan na jajima inokuliše se u deset pilića starosti 6 nedelja (0,1 ml 1/10 rastvora alantoične tečnosti koja sadrži HA titar veći od 1:16). Narednih 10 dana vrši se posmatranje pilića u cilju otkrivanja pojave kliničkih simptoma bolesti. Rezultati su sažeti u pokazatelj koji ukazuje na HPAI virus kada su dobijene vrednosti veće od 1,2. Druga mogućnost je da se radi o HPAI izolatu je kada u toku perioda posmatranja uginu najmanje 7 od 10 (75%) inokuliranih pilića.

Pomoću opisanih klasičnih postupaka dijagnoza AIV se postavi za pet dana, ali je ponekada za isključenje njegove prisutnosti potrebno i dve nedelje. Pored dijagnostičkih sredstava visokog kvaliteta (SPF jaja, H- i N-podtip specifični antiserumi) potrebni su i iskusni stručnjaci. Za sada ne postoje ćelijske kulture za izolaciju AIV koje mogu da postignu osjetljivost embrionisanih kokošijih jaja ([Seo 2001](#)).

(ii) Mnogo brži način je korišćenje molekularnih tehnika, posebno kada je potrebno samo isključiti zarazu. I ove tehnike slede u kaskadnom stilu: otkrivanje prisutnosti za grip A specifične RNA vrši se pomoću reakcije lanca reverzne transkriptivne polimeraze (RT-PCR), kojoj su cilj fragmenti M gena koji je najbolje očuvani segment genoma virusa gripa (Fouchier 2000, Spackman 2002), ili gen nukleokapside (Dybkaer 2004). Kada se dobije pozitivan rezultat, nastavlja se sa reakcijama RT-PCR raširenosti fragmenata gena za hemaglutinin za podtipove H5 i H7. Time se otkriva prisutnost virusa gripa koji se mora obavezno prijaviti (Dybkaer 2004, Spackman 2002). Kada je ovaj rezultat pozitivan, onda je izvodljiva molekularna dijagnoza patotipa (LP odnosno HP) posle sekvencioniranja fragmenta HA gena što obuhvata endoproteolitički rascepljeni kraj. Izolate kod kojih je prisutno više vrsta aminokiselina klasifikuje se kao HPAI. PCR i druge DNA tehnike bile su namenjene za detekciju sojeva H5N1 azijskoga roda (Collins 2002, Payungporn 2004, [Ng 2005](#)). Pomoću kanonične RT-PCR je moguća identifikacija i ne-H5/H7 podtipova koja se nastavlja sekvencijalnom analizom HA-2 podjedinice (Phipps 2004). Postoje i specifične mase za svaki NA podtip. Potpuna karakterizacija je moguća unutar 3 dana posebno ukoliko se koriste najnovije PCR tehnike (Perdue 2003, Lee i Suarez 2004). Međutim u razvoju su i DNA čipovi i to će omogućiti neometanu tipizaciju AI virusa (Li 2001, Kessler 2005). Isključenje dijagnoze je moguće u jednom danu.

Slabosti molekularne dijagnostike su cena opreme i materijala, ali je zato, u poređenju sa izolacijom virusa na kokošijim jajima, moguće analiziranje većeg broja uzoraka uz manje

ljudstva i u mnogo kraćem vremenu. Ne sme se prikriti činjenica da svaka PCR, ili reakcija hibridizacije, za razliku od izolacije virusa na jajima, skriva značajnu unutrašnju nesigurnost koja je povezana sa prisustvom specifičnih mutacija u datom izolatu na krajevima za povezivanje primera i/ili u samim probama-sondama što može da prouzrokuje lažno negativnu reakciju.

Za kompenzovanje slabosti ova dva dijagnostička postupka najbolje je kombinovanje molekularnih (npr. za potrebe skrininga) i klasičnih pristupa (npr. za konačno karakterisanje izolata i za potvrdu dijagnoze kod indusnog obolevlog).

Brze analize su oblikovane za potrebe detekcije virusnog antigena u otiscima briseva tkiva i u kriostatским odrescima pomoću imunofluorescencije, ili enzimske tehnike (ELISA) i sistema dip-stick lateral flow systems u tečnosti briseva. Do sada su se ove tehnike pokazale kao manje osetljive u odnosu na izolaciju virusa ili u odnosu na PCR. Zbog toga ih se ne prihvata kao odgovarajuće za potvrdu dijagnoze, posebno kod indeksnih slučajeva (Davison 1998, Selleck 2003, Cattoli 2004). Korišćenje tzv. pen side testova u veterinarskoj praksi na terenu još uvek je u povojima i potrebno ih je još dalje razvijati.

### **Indirektna detekcija AIV infekcije**

Serologija na osnovu jata (kolektiva) korisna je za potrebe skrininga (Beck 2003). Međutim za detekciju AIV specifičnih antitela, u uzorcima seruma ptica ili u žumancetu u jatima nosilja, još uvek zlatni standard predstavlja analiza inhibicije hemaglutinacije (HI) pomoću referentnih podtipova antigena. Otkrivanje grupno specifičnih antitela (influenca virus tip A) protiv nukleokapsidnog proteina moguće je i pomoću agar gel imunoprecipitacije i pomoću ELISA (Meulemans 1987, Snyder 1985, Jin 2004). Kompetitivni ELISA formati omogućavaju pregledanje seruma svih specijesa ptica, nezavisno od toga da li su na razpolaganju specijes - specifični konjugati (Shafer 1998, Zhou 1998). Opisan je ELISA format za detekciju H7-specifičnih antitela (Sala 2003) međutim za sada ne postoji takav test za detekciju H5 specifičnih antitela u ptičjim serumima.

Kinetika podtip specifičnih antitela je zavisna od karakteristika soja virusa i prvenstveno od specijesa domaćina. Kod kokošijih vrsta ptica prisustvo AIV-specifičnih antitela može da se otkrije tokom druge nedelje posle ekspozicije; antitela u žumancetu jajeta se mogu detektovati posle nekoliko dana (Beck 2003). Produkcija i detekcija antitela kod specijesa *Anatidae* je još više varijabilna (Suarez i Shultz-Cherry 2000).

## **Prenos**

### **Prenos među pticama**

Virusi ptičje gripe niske patogenosti kod vodenih ptica imaju stabilan genetski ciklus (Webster 1992). Ciklus zaražavanja među pticama zavisi od lanca fekalno-oralnog prenosa. Pored direktnog prenosa sa domaćina na domaćina, kod sisara je značajan i indirektni način prenosa preko vode koja je kontaminirana virusima i preko predmeta (ljudi, svinje, konji) gde preovlađuje prenos preko aerosola. Kod ptica je izmerena najveća ekskrecija koja iznosi do  $10^{8.7} \times 50\%$  infektivne doze za jaje ( $EID_{50}$ ) na gram fecesa (Webster 1978). Prosečni titrovi će biti mnogo manji. Virus ptičjeg gripa uprkos svojoj delikatnoj morfologiji, imaju iznenađujuću sposobnost da u spoljašnjoj sredini očuvaju zaraznost, posebno u površinskim vodama (Stallknecht 1990a+b, Lu 2003). Virus suspendovani u vodi su zaraznost sačuvali više od 100 dana na temperaturi od 17°C. Na temperaturi pod -50°C je moguće virus čuvati beskonačno. Podaci Itoa i sar. (1995) i Okazakija i sar. (2000) pružaju dokaz da su virusi ptičjeg gripa u palearktičkim predelima zaštićeni u smrznutoj vodi jezera u toku zime bez prisustva njihovih prirodnih migracionih domaćina. Posle povratka zbog razmnožavanja u narednoj sezoni ptice ili njihovi (osetljivi) naslednici ponovo se zaraze virusima koji se slučajno oslobađaju iz odmrznute vode. Na osnovu ovih činjenica pretpostavlja se da se virusi gripa u ledu životne sredine očuvaju tokom dugih perioda (Smith 2004), te da iz tih rezervoara stari virusi i genotipovi mogu da se recikliraju (Rogers 2004).

Ulazak H5 ili H7 podtipova LPAI virusa u osetljiva jata živine je osnova za lanac zaraza koje mogu da dovedu do razvoja visokopatogenih biotipova *de novo*. Najveći rizik da se zaraza prenese sa divljih ptica na domaću živinu je kada se domaća živina drži na otvorenom, kada živina ima zajedničke izvore vode sa divljim pticama, ili kada koristi vodu i hranu koja može da bude kontaminirana izlučevinama divljih ptica koje su nosioci virusa (Capua 2003, Henzler 2003). Ptice se mogu da se zaraze direktnim kontaktom sa životinjama koje izlučuju virus,

kontaktoom sa njihovim izlučevinama, ili kontaktoom sa vektorima (abiotski) koji su kontaminirani materijalom koji sadrži viruse. Kada jednom uđe u domaća jata LPAIV može i ne mora da bude zavisao od od faze adaptacije na specijes živine da bi se izlučivao u količinama koje su dovoljne za omogućavanje horizontalne transmisije unutar jata i među jatima. Kada u jatu koje je zaraženo sa LPAI nastane HPAI, on se širi na isti način kao i LPAI. Takozvane »mokre« pijace, na kojima se prodaje živa živina u uslovima prenatrpanosti su multiplikatori širenja (Shortridge 1998, Bulaga 2003).

Mere za sprovođenje biološke zaštite namenjene za izolaciju velikih poseda sa živinom efikasno sprečavaju prenos zaraze sa farme na farmu preko mehaničkih sredstava kao što su kontaminirana oprema, vozila, hrana, kavezi ili odeća – posebno cipele. Prilikom analize epizootije HPAI u Italiji godine 1999/2000. otkrili su sledeće rizike za prenos: preseljavanje zaraženih jata (1,0%), posredni kontakti tokom prevoza u klanicu (8,5%), blizina zaraženog jata u radijusu 1 km (26,2%), vozila za prevoz hrane, stelje ili leševa (21,3%), ostali indirektni kontakti tokom smenjivanja osoblja na farmi, radne mehanizacije itd. (9,4%) (Marangon i Capua 2005). U toj epidemiji nije bilo pokazatelja o aerogenem širenju. Međutim u epizootiji u Holandiji (2003) i u Kanadi (2004) su uzeli u obzir i aerogeni prenos (Landman i Schrier 2004, [Lees 2004](#)). Uloga živih vektora kao što su pacovske buve, koje mogu da deluju kao »mehanički vektori« koji nisu zaraženi, i nije neosnovana, međutim vektori ne predstavljaju glavni činilac prenosa.

Do pojave azijskog roda H5N1 HPAIV ponovno prelaženje HPAIV iz živine u populaciju divljih ptica nije imalo neku važnu ulogu. Aprila 2005. se na jezeru Qinghai u severoistočnoj Kini pojavilo oboljenje koje je prouzrokovao azijski rod H5N1 i zahvatilo je na hiljade gologlavih gusaka i druge vrste migratornih patki, kormorana i galebova (Chen 2005, Liu 2005). Zbog toga je potrebno ubuduće imati u vidu da će viruse azijskog roda H5N1 prenositi divlje ptice i to treba imati u vidu prilikom oblikovanja preventivnih mera (sledi diskusija o tome).

Od kraja 2003. godine su u Aziji bili otkriveni neki virusi H5N1 koji su visokopatogeni za kokoši, ali ne i za patke ([Sturm-Ramirez 2005](#)). Prilikom eksperimentalnih infekcija tim izolatima dobili su prilikom genetske analize heterogenu smešu i sposobnost oblikovanja plakova u kulturi tkiva (Hulse Post 2005). Patke inficirane ovim izolatima, koje su preživele zarazu, izlučivale su virusnu populaciju do 17 dana. Populacija virusa nije izgubila patogeni potencijal za patke. Pri korišćenju kliničkih znakova za utvrđivanje prisutnosti HPAIV H5N1 na terenu patke bi mogle biti »Trojanski konj« za ovaj virus ([Webster 2006](#)).

## **Prenos na ljude**

Prenos virusa ptičjeg gripa na ljude koji prouzrokuje klinički prepoznatljivo oboljenje vrlo je retka pojava (Tabela 3). Imajući u vidu činjenicu da su u jugoistočnoj Aziji virusu HPAIV H5N1 potencijalno eksponirani milioni ljudi, realni broj dokumentovano obolelih je mali, iako poslednjih godina raste ([http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/country/en](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/en)).

Prvu vezu azijskog roda HPAIV H5N1 sa pojavom respiratornog oboljenja kod ljudi su otkrili 1997. god. u Hong Kongu. Tada je 6 od 18 lica zaraženo virusom H5N1. Oboleli su bili epidemiološki povezani sa epizootijom koja je harala na pijacama sa živim pticama, a koju je prouzrokovao visokopatogeni H5N1 (Yuen 1998, Claas 1998, [Katz 1999](#)). Rizik direktnog prenosa virusa H5N1 sa ptica na čoveka izgleda da je najveći kod lica koja su u tesnom kontaktu sa živom zaraženom živinom, ili sa površinama, ili sa predmetima koji su kontaminirani izlučevinama zaražene živine. Rizik ekspozicije je najveći pri klanju, čišćenju perja, rezanju na komade i pri pripremanju živine za kuvanje ([http://www.who.int/csr/don/2005\\_08\\_18/en/](http://www.who.int/csr/don/2005_08_18/en/)). Prisutnost azijskog roda virusa HPAI H5N1 bila je utvrđena u telima uginulih ptica u svim tkivima uključujući i meso. Više puta je bilo prijavljeno da su obolela i umrla lica koja su klala ili su pripremala meso obolelih ptica za konzumaciju, dok drugi članovi porodice koji su takvo meso jeli nisu oboleli ([http://www.who.int/csr/don/2005\\_10\\_13/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2005_10_13/en/index.html)).

Tabela 3. Dokumentovane infekcije ljudi virusima ptičjeg gripa *					
Datum	Država/predeo	Soj	Obolelo (umrlo)	Simptomi	Izvor
1959.	SAD	H7N7**	1	Respiratorni	Putovanje u inostranstvo
1995.	VB	H7N7	1	Konjunktivitis	Kućne patke (delile su jezero sa migratornim pticama)
1997.	Hong Kong	H5N1**	18 (6)	Respiratorni/ pneumonija	Živina
1998.	Kina (Guangdong)	H9N2	5	Nepoznati	Nepoznat
1999.	Hong Kong	H9N2	2	Respiratorni	Perutnina, nepoznato
2003.(feb.)	Hong Kong	H5N1**	2 (1)	Respiratorni	Nepoznat
2003. (mar.)	Holandija	H7N7**	89 (1)	Konjunktivitis (pneumonija, respiratorni zastoj kod obolelih sa fatalnim ishodom)	Živina
2003. (dec.)	Hong Kong	H9N2	1	Respiratorni	Nepoznat
2003.	New York	H7N2	1	Respiratorni	Nepoznat
2003.	Vijetnam	H5N1**	3 (3)	Respiratorni	Živina
2004.	Vijetnam	H5N1**	29 (20)	Respiratorni	Živina
2004.	Tajland	H5N1**	17 (12)	Respiratorni	Živina
2004.	Kanada	H7N3**	2	Konjunktivitis	Živina
2005.	Vijetnam	H5N1**	61 (19)	Respiratorni	Živina
2005.	Tajland	H5N1**	5 (2)	Respiratorni	Živina
2005.	Kina	H5N1**	7 (3)	Respiratorni	Živina
2005.	Kambodža	H5N1**	4 (4)	Respiratorni	Živina
2005.	Indonezija	H5N1**	16 (11)	Respiratorni	Živina
2006.	Turska	H5N1**	3 (3)	Respiratorni	Živina

\* Izvor: Avian influenza - assessing the pandemic threat. WHO, [http://www.who.int/csr/disease/influenza/WHO\\_CDS\\_2005\\_29/en/](http://www.who.int/csr/disease/influenza/WHO_CDS_2005_29/en/), preuzeto 06. januara 2006.

\*\* Visokopatogen za živinu

Soj H9N2 je prouzrokovao blagi oblik gripu sličnog oboljenja kod dvoje dece u Hong Kong SAR 1999. godine i kod jednog deteta sredinom decembra 2003. godine (Saito 2001, Butt 2005). Soj H9N2 koji je istovremeno kružio kod živine je prouzrokovao pojavu značajnih simptoma i visoki stepen smrtnosti kod osetljivih specijesa kao što su ćurke i kokoši. Do danas nije bilo dokaza da bi dobro termički obrađeno živinsko meso ili proizvodi od živinskog mesa bili izvor zaraze za ljude virusima azijskog roda H5N1. SZO kao opšte pravilo preporučuje temeljitu termičku obradu mesa tako da je meso u svim unutrašnjim delovima zagrejano na temperaturu od 70°C. Na toj temperaturi se virusi gripa inaktiviraju dakle, od virusom H5N1 kontaminiranog sirovog mesa ono postaje bezbedno živinsko meso ([WHO 2005](#)).

### Prenos na druge sisare

Virusi ptičjeg gripa su u više prilika prouzrokovali infekciju različitih vrsta sisara. I kod njih je moguće da se posle ciklusa replikacija i adaptacija utemelje novi epidemijski rodovi. Svinje su posebno često bile uključene u ove »interklasne transverzije«. U populacijama evropskih

svinja preovlađuju virusi slični ptičjem gripu H1N1 ([Heinen 2002](#)), kao i virus H1N2 koji je rezultat reasortiranja humani-ptičji virus. Prvi put je izolovan u Velikoj Britaniji 1992. g. i od tada je stalno prisutan (Brown 1998). U SAD cirkuliše trostruko reasortirani (H3N2) između klasičnog H1N1, čovečijeg H3N2 i ptičjeg podtipa (Olsen 2002). Ostali podtipovi koji su verovatno ptičjeg porekla (npr. H1N7, H4N6) bili retko otkrivani kod svinja (Brown 1997, Karasin 2000). Virus ptičjeg porekla H9N2 je umereno raširen u populacijama svinja na istoku Kine (Xu 2004). Od ptica se virusima gripe A mogu zaraziti i morski sisari i konji (Guo 1992, Ito 1999).

Prirodna infekcija sa H5N1 bila je opisana kod tigrova i drugih velikih mačka u zoološkom vrtu u Tajlandu jer su ove životinje hranili leševima živine koja je bila zaražena virusom ([Keawcharoen 2004](#), Quirk 2004, Amosin 2005). Posledica je bio teški oblik oboljenja sa visokim mortalitetom. U istom zoološkom vrtu je došlo i do prenosa sa mačke na mačku ([Thanawongnuwech 2005](#)). To je bio prvi prijavljeni primer zaraze virusom gripa kod *Felidae*. U Evropi su virusom H5N1 u eksperimentalnim uslovima zarazili kućne kratkodlake mačke (Kuiken 2004).

Godine 2004. su u Vijetnamu sakupili oko 3.000 uzoraka seruma uzetih od slobodnih svinja lualica koje su testirali da bi našli dokaze o njihovoj eksponiranosti virusu gripa H5N1 (Choi 2005). Metodama neutralizacije i Western blot su potvrdili seropozitivnost samo u 0,25% uzoraka. Prilikom eksperimentalnih zaražavanja bilo je dokazano da je moguće zaražavanje svinja virusima H5N1 koji su bili izolovani 2004. g. u Aziji i po poreklu su humani ili ptičji. Jedini simptomi koji su se pojavili 4 dana po zaražavanju bili su blagi kašalj i povećana telesna temperatura. Virus je moguće izolovati iz tkiva gornjih respiratornih organa bar 6 dana po zaražavanju. Vrhunac titrova virusa u brisevima nosa je 2 dana po zaražavanju, ali ni jedna eksperimentalno zaražena životinja nije prenela zarazu na svinje iz kontakta. Izgleda da visokoletalni H5N1 virusi koji kruže po Aziji mogu da zaraze svinje na prirodan način. Međutim incidenca ovih infekcija je vrlo niska. Ni jedan od testiranih ptičjih ili humanih H5N1 virusa se u eksperimentalnim uslovima nije prenosio među svinjama (Choi 2005). Na osnovu ovih nalaza svinje verovatno momentalno nemaju važnu ulogu u epidemiologiji azijskog roda H5N1.

Epizootija visokopatogenog H7N7 ptičjeg gripa kod živine u Holandiji, Belgiji i u Nemačkoj proleća 2003. g. prouzrokovala je zaražavanje 89 radnika koji su bili eksponirani zaraženim životinjama i leševima. Kod njih je opisana pojava blagog oblika oboljenja, pretežno konjunktivitis (Koopmans 2004). Zaraza je kod jednog veterinara prouzrokovala sindrom akutnog respiratornog distresa i imala je smrtni ishod ([Fouchier 2004](#)). U toku epizootije u Holandiji zaraza sa H7N7 je bila virusološki i serološki potvrđena i kod većeg broja kućnih kontakata. Od toga je četvoro lica imalo konjunktivitis (Du Ry van Beest Holle 2005). Dokazi o zaražavanju (asimptomatskom) ljudi prirodnim putem sa LPAIV sojevima podtipova H9, H7 i H5 opisani su i u drugim prilikama u Italiji i u Japanu (Zhou 1996, [Puzelli 2005](#), Promed 20060110.0090).

U nepotvrđenom izveštaju (Promed Mail 20050826) bila je pomenuta zaraza sa H5N1 sa smrtnim ishodom kod 5 retkih cibetki koje su rođene u kavezima, u nacionalnom parku u Vijetnamu. Izvor zaraze je ostao nerazjašnjen. Preostalih 20 cibetki iste vrste, koje su bile u susednim kavezima, nisu obolele.

Virusi ptičjeg gripa nikada nisu bili nađeni kod pacova, zečeva i kod različitih drugih sisara, koji su prisutni na pijacama živih ptica u Hong Kongu gde su utvrdili da je 20% živine pozitivno na azijski rod H5N1 (Shortridge 1998).

## **Epidemiologija Živina**

Do kraja 2003. godine je preovladavalo mišljenje da je HPAI kod živine retko oboljenje. Od 1959. godine su u svetu bile registrovane samo 24 epizootije (Tabela 1). Većina ih se odigrala u Evropi i na američkom kontinentu. Većina epizootija bile su geografski ograničene. Samo 5 ih se raširilo na brojne farme i samo jedna se raširila do međunarodnih razmera. Ni jedna od njih nije bila ni približno veličine epizootija u Aziji koje su bile prouzrokovane sa H5N1 2004. godine ([WHO 2004/03/02](#)). Do sada su sve epizootije visokopatogenog oblika bile prouzrokovane virusima gripa A podtipova H5 i H7.

U epizootijama u prošlosti faktori širenja HPAIV su bili nelegalna prodaja ili prevoz zaraženih živih ptica ili neprerađenih proizvoda, nenamerni mehanički prenos virusa uzrokovan kretanjem ljudi (putnici, izbeglice).

Nova dimenzija epizootija HPAI pojavila se krajem 2003. godine. Od sredine decembra 2003. do početka februara 2004. epizootije kod živine prouzrokovane sa HPAI H5N1 azijskog roda bile su prijavljene u R. Koreji, Vijetnamu, Japanu, Tajlandu, Kambodži, Laosu, Indoneziji i u Kini. Istovremena pojava epizootija u više država kod domaće živine do sada je bez presedana. Svi naponi usmereni na ograničavanje bolesti su ostali bez uspeha. Uprkos prikupljanju i uništavanju oko 150 miliona ptica je H5N1 sada postao endemičan u brojnim delovima Indonezije i Vijetnama, kao i u nekim predelima Kambodže, Kine, Tajlanda i verovatno u Laosu.

Originalni – izvorni virus prvi put je dijagnostikovao 1997. godine, potiče od reasortiranih roditelja uključujući u najmanju ruku virus H5N1 iz domaćih gusaka (A/goose/Guangdong/1/96, koji je dao HA) i H6N1 virus najverovatnije iz divljih patki (A/teal/Hong Kong/W312/97, koji je dao NA i segmente za unutrašnje proteine) i prošao je mnogo ciklusa reasortiranja sa drugim nepoznatim virusima ptičjeg gripa (Xu 1999, [Hoffmann 2000](#), Guan 2002b). Opisano je više različitih genotipova roda H5N1 ([Cauthen 2000](#), [Guan 2002a](#)+2003). Takozvani genotip 'Z' je dominirao u epizootijama od decembra 2003. g. (Li 2004).

U aprilu 2005. je soj H5N1 po prvi puta dostigao još jedan nivo epizootije kada je dobio široki pristup do populacija divljih ptica (Chen 2005, Liu 2005). Na jezeru Qinghai na severozapadu Kine je više hiljada migratornih gologlavih gusaka podleglo zarazi. Takođe je bilo zahvaćeno više vrsta galebova i kormorana. Kada su prvi put prijavljene epizootije H5N1 u leto i ujesen 2005. u geografski susednoj Mongoliji, Kazahstanu i u južnom Sibiru, posumnjalo se na ptice selice. Naredne epizootije se krajem 2005. pojavljuju duž i između migratornih puteva iz unutrašnje Azije u smeru srednjeg Istoka i Afrike. Zahvatile su Tursku, Rumuniju, Hrvatsku i poluostrvo Krim 2005. U svim slučajevima (izuzev Mongolje i Hrvatske) bili su zahvaćeni živina i divlje vodene ptice. Indeksni slučaj (prvi slučaj) se kod živine najčešće pojavi kod živine koja je u blizini jezera i močvara nastanjenih divljim vodenim pticama. To ukazuje na direktnu sumnju da migratorne ptice šire virus, ali treba napomenuti da je azijski rod virusa HPAI H5N1 do sada bio utvrđen kod vodenih ptica koje su bile u fazi uginjavanja ili kod već uginulih vodenih ptica. Stvarni status H5N1 u populacijama divljih vodenih ptica i njihova uloga u širenju zaraze ostaje za sada tajna. Danas je moguće samo hipotetisati o tome da li su divlje vodene ptice sposobne da nose virus na velike razdaljine tokom inkubacionog perioda i da li stvarno neke vrste ostaju mobilne uprkos zaraženosti sa H5N1.

U međuvremenu su studije u Kini pokazale prisutnost većeg broja genotipova azijskoga roda virusa H5N1 kod 3 vrapca (Kou 2005). Simptome zaraze nisu pokazivali ni vrapci iz kojih je virus izolovan, kao ni patke koje su s tim virusima eksperimentalno zarazili. Međutim posle prenosa na kokoši je izazvan potpuni razvoj HPAI. Različiti vrapci iz istog jata nose više različitih genotipova koji verovatno nastaju reasortiranjem sa različitim AI virusima nepoznatih karakteristika. Sumnja se da su virusi slični H5N1 nekada pre bili preneseni na te ptice (pre više meseci?). To ukazuje na još jedan korak pogoršanja situacije: vrapci su zbog svojih životnih navika idealni posrednici između divljih ptica i domaće živine i mogu u tim populacijama da prenose HPAI viruse. Lokalno ograničena zaraza prouzrokovana sa visokopatogenim HP H5N1 kod pojedinih (obolelih ili uginulih) vrabaca bila je utvrđena i u Tajlandu i u Hong Kongu. Endemičnost HPAIV kod sesilnih ptica kao što su vrapci, čvorci, laste, koje žive u tesnoj povezanosti sa naseljima ljudi, nisu samo ogromni pritisak na lokalnu živinsku industriju, nego će povećati iz rizik ekspozicije za ljude (Nestorowicz 1987).

## Ljudi

Do 30.12.2005. bila su registrovano 142 obolela lica, čije je obolevanje prouzrokovano sa H5N1. Epidemija je za sada ograničena na Kambodžu, Indoneziju, Tajvan i na epicentar u Vijetnamu (65.5% svih obolelih). Umrle su 72 (50.7%) lica.

Za više detalja vidi poglavlje »Epidemiologija«.

## Ekonomske posledice

Epizootije visokopatogenog ptičjeg gripa u zahvaćenom predelu mogu da prouzrokuju katastrofalne posledice i za pojedine uzgajivače i za živinsku industriju u celini (vidi tabelu 1). Ekonomski gubici su obično samo delimično prouzrokovani neposrednim pomorom živine zbog zaraze sa HPAI. Mere koje moraju da se sprovedu u cilju sprečavanja širenja oboljenja su obavezne i temeljite. Isto tako u državama u razvoju može da dođe do katastrofalnih posledica u ishrani jer je u tim državama živina bitan izvor proteina životinjskog porekla.

Kada se epizootija raširi njeno savladavanje je vrlo teško i za to je potrebno više godina ([WHO 2004/01/22](#)).

## Mere za savladavanje HPAI

Zbog potencijalno uništavajućih ekonomskih posledica koje može da prouzrokuje HPAI je u celom svetu pod pomnim posmatranjem i praćenjem i zakonski propisano. Oboljenje se obavezno prijavljuje (Pearson 2003, [OIE Terrestrial Animal Health Code 2005](#)). Mere koje se sprovode zavise od epizootološke situacije u zahvaćenom regionu. U Evropskoj zajednici (EU) HPAIV nije endemičan i zabranjena je profilaktička vakcinacija protiv ptičjeg gripa. Zbog toga se očekuje da će epizootije kod živine biti očigledne zbog klinički uništavajućeg toka bolesti. Stoga se, kad se suoči sa epizootijom, sprovode agresivne mere za savladavanje bolesti, npr. označavanje zahvaćenih i kontaktnih imanja sa ciljem momentane eradikacije virusa HPAI i ograničavanje epizootije na indeksnom imanju.

Za tu svrhu se postave zone suzbijanja i nadzora oko indeksnog slučaja, promer zone je u različitim državama različit (u EU je 3 km i 10 km). Standardne mere za suzbijanje u cilju sprečavanja bočnog širenja na druga gazdinstva su karantin zaraženih i kontaktnih gazdinstava, brzo uništavanje svih zaraženih ili eksponiranih ptica i bezbedno uklanjanje leševa ([OIE - Terrestrial Animal Health Code](#)). Ključni značaj u toku epizootije ima onemogućavanje kretanja žive živine i prerađevina živinskog porekla unutar države i između država.

Pored toga u neendemskim predelima se preporučuje suzbijanje podtipova H5 i H7 LPAI kod živine, uz testiranje i uništavanje akutno zaraženih pogona. Sa time se u ovakvim pogonima smanjuje rizik nastajanja i razvoja HPAIV.

Pri ovakvom načinu eradikacije mogu da se pojave specifični problemi u predelima (i) sa visokom gustom populacijom živine (Marangon 2004, [Stegemann 2004](#), Mannelli 2005) i (ii) tamo gde preovlađuju mala gazdinstva sa živinom koju drže na otvorenom (Witt i Malone 2005). Zbog neposredne blizine gazdinstava sa živinom i zbog isprepletene strukture prerade širenje oboljenja je brže nego što su učinci mera za eradikaciju. Usled toga tokom epizootije u Italiji 1999/2000. nisu uništavali samo zaražena i kontaktna gazdinstva nego i jata koja su bila u riziku od zaražavanja koja su unutar promera 1 km od zaraženog gazdinstva. Uprkos svemu ovakva eradikacija trajala je 4 meseca i pri tome je uništeno 13 miliona ptica (Capua 2003). Uspešnu eradikaciju HPAIV u Holandiji 2003. g. i u Kanadi 2004. g. postigli su tako što oko zaraženih gazdinstava uspostavili pufer zonu široku od 1 do više kilometara. Time su potpuno obuhvatili svu živinu. Pri tome je bilo uništeno 30 miliona odnosno 19 miliona ptica. Godine 1997. su u Hong Kongu u tri dana pobili celokupnu populaciju živine (29, 30, i 31. decembra: 1,5 miliona ptica). Namera je bila neodložna eradikacija HPAIV po cenu uništavanja i nezaraženih životinja, što je izvodljivo u komercijalnim pogonima i u urbanim uslovima. Ovo će jako pogoditi živinsku industriju u pufer zoni i kod javnosti uzrokuje pomisao o etičnosti uništavanja miliona zdravih i nezaraženih životinja.

Mere se najteže sprovode u ruralnim predelima koji imaju tradicionalni oblik uzgoja živine na otvorenom, pošto se živina koja je na otvorenom sreće sa divljim pticama ili sa njima ima zajedničke izvore vode. Osim toga, domaće patke privlače divlje patke i time oblikuju važnu veznu kariku u lancu prenosa između divljih ptica i domaćih jata ([WHO 2005](#)). Takvi uslovi mogu da obezbede dobro tle za HPAI viruse na kojem mogu da dosegnu endemsko stanje. Endemičnost HPAI u određenim regionima predstavlja stalni pritisak na živinarstvo. Gore navedene restrikcije nije moguće održavati u toku dužih vremenskih perioda a da se pri tome ne prouzrokuje znatna šteta živinskoj industriji zemlje. U državama u razvoju restrikcije prouzrokuju deficit u snabdevanju stanovništva proteinima. Zbog toga je potrebno razmotriti sprovođenje drugih mera.

U takvim okolnostima je bila sprovedena opšta vakcinacija koja predstavlja još jedno dodatno sredstvo u procesu eradikacije epizootija u neendemskim područjima.

## Vakcinacija

Vakcinacija u veterini ima 4 cilja: (i) zaštita od nastajanja kliničkog oboljenja, (ii) zaštita od zaražavanja virulentnim virusom, (iii) zaštita od izlučivanja virusa i (iv) serološko diferenciranje inficiranih od vakcinisanih životinja (tzv. DIVA akronim).

Na području vakcinacije protiv gripa ove zahteve nisu ispunile vakcine koje su u komercijalnoj upotrebi, kao ni vakcine koje su na eksperimentalnim testiranjima (Lee i Suarez 2005). Prvi cilj – zaštita od kliničkog oboljenja prouzrokovanog sa HPAIV ispunjava većina vakcina. Postiže

se spreprečavanje rizika zaražavanja vakcinisanih, ali se postiže samo smanjenje izlučivanja virusa, a ne i da se spreči izlučivanje. To u endemskim predelima, u kojima se sprovodi masovna vakcinacija, može da prouzrokuje značajan epidemiološki problem. Vakcinisane ptice koje izgledaju zdrave mogu da budu zaražene i mogu da izlučuju divlji virus pod »maskom«. Efikasnost smanjivanja izlučivanja virusa bitna je za glavni cilj mera za suzbijanje, to je eradicacija divljeg virulentnog virusa. Efikasnost je moguće kvantifikovati pomoću činoca  $r_0$ . Pod pretpostavkom da vakcinisano i zaraženo jato prenosi zarazu u proseku na manje od jednog jata ( $r_0 < 1$ ) virulentni virus je na matematičkim osnovama sklon istrebljenju ([van der Goot 2005](#)). Kada imamo posla sa vakcinacijom protiv potencijalno epizoonotskog H5N1 virusa, redukcija ekskrecije virusa takođe redukuje rizik prenosa na ljude jer izgleda da je potrebna velika doza da bi se probila specijesna prepreka između ptica i ljudi. Pored svega DIVA tehnika omogućava praćenje zaražavanja kod vakcinisanih ptica sa divljim virusom upotrebom serologije.

U praksi treba pratiti više elemenata (Lee i Suarez 2005):

- vakcine ne smeju da sadrže viruse koji mogu da se replikuju zbog potencijala genetskog reasortiranja, isto i kod potipova H5- i H7- rizik za spontane mutacije koji vodi ka povećanoj patogenosti. Zbog toga su i zabranjene žive atenuirane vakcine.
- zaštita živine od HPAI je u velikoj meri zavisna od HA-specifičnih antitela. Zbog toga vakcinalni soj treba da ima isti H podtip kao i divlji virus. Idealno uklapanje vakcinalnog i divljeg virusa kod živine nije neophodno kao što je to neophodno kod vakcina za ljude. Kod živine je dovoljno da se indukuje homopodtip unakrsno reaktivni imunitet zbog sadašnjeg nepostojanja vakcinom vođenog antigenskog drifta kod virusa ptičjeg gripa što je prouzrokovano nesprovođenjem masovne vakcinacije.
- obavezno je korišćenje markera (DIVA) postupka (Suarez 2005). Alternativno se za praćenje mogu koristiti sentinel ptice koje nisu bile vakcinisane.

Do sada je pripremljen ceo niz koncepata vakcinacije. Većina ih još uvek bazira na inaktiviranoj vakcini iz celog virusa sa adjuvansom. Vakcina se mora aplikovati iglom i špricom svakoj životinji posebno.

Inaktivisane homologne vakcine, napravljene od aktuelnog soja HPAI, indukuju odgovarajuću zaštitu, ali nije moguća serološka distinkcija vakcinisanih i nevakcinisanih ptica. Vakcina je napravljena od aktuelnog HPAI virusa, znači već postoji inherentno kašnjenje pre njene upotrebe na terenu.

Inaktivirane heterologne vakcine moguće je koristiti kao marker vakcine kada vakcinalni virus ima isti HA podtip kao i divlji virus, ali različit NA podtip (npr. H5N9 vakcina prema H5N2 HPAI). Detekcijom NA podtip specifičnih antitela moguće je razlikovanje vakcinisanih od zaraženih ptica (Cattoli 2003). Ipak ove metode mogu da budu komplikovane i mogu da budu neosetljive. Bez obzira na sve u bankama vakcina treba imati vakcine koje sadrže više H5- i H7-podtipova koji imaju različite NA podtipove. Reverzna genetika će ogromno pomoći u izradi vakcina za veterinarsku i medicinsku upotrebu, tako da će vakcine imati željene kombinacije HxNy u pogodnom genetskom okruženju (Liu 2003, Neumann 2003, Subbarao 2003, Lee 2004, Chen 2005, Stech 2005). Sada su u upotrebi inaktivirane heterologne vakcine koje se koriste u žarištima u jugoistočnoj Aziji, Meksiku, Pakistanu i u severnoj Italiji (e.g. Garcia 1998, Swayne 2001). Kao alternativa DIVA sistemu pri korišćenju inaktiviranih vakcina predložena je detekcija NS-1 specifičnih antitela (Tumpey 2005). Ova antitela nastaju u visokim titrovima prilikom zaražavanja ptica na prirodan način, ali su prilikom korišćenja inaktivirane vakcine titri mnogo niži.

Rekombinantne žive vektor vakcine vrše ekspresiju gena H5 ili H7 HA u viruse ili u bakterije-vektore koji mogu da zaraze živinske specijese (npr. ptičji pox virus [Beard 1991, Swayne 1997+2000c], virus laringotraheitisa [Lueschow 2001, Veits 2003] ili virus Newcastle bolesti [Swayne 2003] između ostalih). Pošto su to žive vakcine, moguća je njihova masovna aplikacija vodom ili sprejevima. Iako omogućavaju jasno DIVA razlikovanje, prethodno stečeni imunitet na vektor virus-bakteriju će znatno ograničavati uspešnost vakcinacije. Neka iskustva sa terena sa rekombinantama ptičjeg pox virusa stečena su u Meksiku i u SAD. Konačno je eksperimentalno dokazana uspešna upotreba rekombinantno utisnutih HA proteina i DNA vakcinacije korišćenjem HA, utisnutog pomoću plazmida (Crawford 1999, [Kodihalli 1997](#)).

Vakcinacija se sada planira na nacionalnom nivou u više država jugoistočne Azije (Normile

2005).

## Rizik pandemije

Za otpočinjanje nove pandemije potrebno je da se ispune tri uslova:

- pojava najmanje jedne generacije virusa gripa HA podtipa koji se do sada nije pojavljivao u populaciji ljudi (ili ponovna pojava),
- da može da zarazi ljude i da se efikasno razmnožava u čoveku,
- da se bez teškoća širi i prenosi među ljudima.

To ukazuje da pretnja od pojave nove pandemije gripa ljudi nije isključivo povezana za pojavu HPAI H5N1. Za sada H5N1 ispunjava samo dva od tih uslova: to je je novi podtip za većinu humane populacije i zarazio je i prouzrokovao težak oblik oboljenja i visoki letalitet kod više od 140 lica. Kod velike većine populacije ljudi ne postoji imunitet protiv virusa sličnih H5N1. Nova pandemija bi mogla biti možda već na horizontu ukoliko bi azijski rod H5N1 dobio osobine za održivi efikasni prenos sa čoveka na čoveka, bilo postupnim adaptiranjem ili reasortiranjem sa virusom koji je već adaptiran na čoveka ([Guan 2004](#)). *In vitro* je već dokazano da dve istovremene razmene amino kiselina na rascepljenim krajevima za receptore u HA proteinu azijskog roda HPAIV H5N1 (Q226L and G228S) optimiziraju povezivanje za humane receptore tipa 2-6, kao što je to kod drugih virusa gripa A koji su adaptirani na čoveka ([Harvey 2004](#)). Gambaryan i sar. (2006) već su identifikovali 2 izolata kod ljudi (otac i sin zaraženi sa H5N1 u Hong Kongu 2003.g.) koji su za razliku od svih ostalih izolata H5N1, koji su bili izolovani kod ljudi i kod ptica, pokazali veći afinitet za receptore 2-6 zbog jedinstvene mutacije S227N na HA1 receptorskom kraju.

Ta mogućnost je možda iza narednog ugla, ili se već dogodila dok čitamo ovaj članak. Međutim, niko to ne može da kaže ni da predvidi. Mogućnosti da se takav događaj pojavi su u direktnoj korelaciji sa brojem virusa koji kruže kod živine i sa rizikom ekspanzije ljudi. Zbog toga se protiv H5N1 borimo na njegovom izvoru, a to će umanjiti rizik za nastanak pandemije koji ovaj virus predstavlja. U jednoj elektronskoj pošti tokom debatnog foruma bio je dat »jerečki« predlog da bi investicija od samo 10% novca, koji je namenjen razvoju specifične vakcine protiv H5 za ljude, upotrebljena za eradicaciju H5N1 kod živine imala veći učinak nego što bi imao učinak vakcinacije ljudi u cilju zaštite pre epidemije. Od prve izolacije kod čoveka 1997. g. H5N1 nije napravio poslednji korak ka pandemičnosti za humane domaćine. Najnovije studije ukazuju da se sve ove godine virulentnost H5N1 za sisare povećala i da se raširio lanac domaćina:

- H5N1 virusi izolovani iz prividno zdravih domaćih patki u kopnenom delu Kine od 1999. do 2002. i u Vijetnamu od 2003. g. su progresivno postajali više patogeni za sisare ([Chen 2004](#)).
- H5N1 je proširio lanac svojih domaćina, sada na prirodan način može da zarazi i da ubije specijese sisara (mačke, tigrovi), za koje je pre važno da su otporni na zarazu virusima ptičjeg gripa ([http://www.who.int/csr/don/2004\\_02\\_20/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2004_02_20/en/index.html)).

Ipak s početkom ovih događanja sa H5N1 u Aziji ne smemo da ispustimo iz vida činjenicu, da se mogu pojaviti i drugi virusi gripa koji možda imaju veći pandemijski potencijal ili da su se u međuvremenu već pojavili. Npr. soj podtipa H9N2, koji pre 1980-tih nije bio nađen u Aziji, ne samo da se raširio u populacijama azijske živine, nego je na jugu i na istoku Kine efikasno preskočio u populaciju svinja (Shortridge 1992, [Peiris 2001](#), Xu 2004). Receptori ovih virusa imaju specifičnosti slične receptorima virusa koji su adaptirani na ljude (Li 2005b, Matrosovich 2001). Ovi H9 virusi imaju široki raspon domaćina koji su genetski različiti i mogu direktno da zaraze čoveka. Soj H9N2 koji je prouzrokovao zaraze ljudi u Hong Kongu imao je genotip sličan genotipu virusa H5N1 iz 1997. godine ([Lin 2000](#)).

## Zaključak

U poslednjoj deceniji se jako povećao značaj visokopatogenog ptičjeg gripa (AI) kao uništavajuće bolesti živine. Osnova ovog procesa je uvođenje AI virusa podtipova H5 i H7 koji imaju nisku patogenost (LP) iz rezervoara divljih vodenih ptica. Ostalo je nerazjašnjeno da li je i, ukoliko jeste, zašto se izmenila i prevalencija LP H5 i H7 u njihovim rezervoarima.

Uzimajući u obzir endemsko stanje azijskog roda HPAI H5N1 u populacijama domaće živine u jugoistočnoj Aziji, koje prouzrokuje česta preskakanja u populacije migratornih ptica, izgleda da je u epizootologiji HPAI neizbežan paradigmatički šift u smeru endemičnosti kod populacija migratornih divljih ptica. To može da ima teške posledice za živinsku industriju u interkontinentalnim razmerama. Rizik ekspozicije se povećao za ljude koji su direktno povezani sa povećanom prisutnošću potencijalno zooantroponoznih virusa kod domaće živine. Uzimajući u obzir ptičju i veterinarsku stranu ostala su još brojna pitanja.

1. Da li je azijski rod HPAIV H5N1 već utvrdio svoj endemski status u populacijama divljih i migratornih ptica?
2. Da li HPAI virus može da razvije atenuirani fenotip kod vrsta divljih ptica i da istovremeno zadrži svoju virulentnosti za živinu?
3. Da li kopneni sisari imaju bilo kakvu ulogu u širenju HPAIV?
4. Da li postoji genetski deo koji kodira endoproteolitički rascepljeni deo HA proteina koji je sklon mutacijama samo kod podtipova H5 i H7?
5. Kakav bi uticaj u Aziji imalo masovno sprovođenje vakcinacije živine protiv H5N1 – da li sprečavanje širenja virusa ili ubrzavanje antigenskog drifta i bekstva?
6. Da li izmenjene prevalencije LPAI podtipova H5 i H7 u njihovim prirodnim rezervoarima potencijalno utiču i na evolucijsku stazu?

Prvo pitanje ima glavni značaj ne samo za veterinu. Endemičnost azijskog roda HPAIV H5N1 kod migratornih ptica može da predstavlja konstantnu pretnju za uzgoj živine. To se može postići jedino sprovođenjem mera biološke zaštite koji obuhvataju zabranu uzgoja živine na otvorenom. Alternativa je masovna vakcinacija živine. Kao drugi pojas endemičnosti kod divljih ptica može da prouzrokuje prisotnost HPAI H5N1 virusa u životnoj sredini (jezera, obalno more itd.) i može da bude dodatni rizik za eksponiranost ljudi. Do sada nije bilo prijava prenosa na ljude sa divljih ptica ili iz životne sredine. Kod svih prijavljenih zaraženih lica uključujući i najnovije iz Turske izgleda da je do zaraze došlo posle amplifikacije virusa i posle tesnog kontakta sa kućnom živinom.

Složenost i potencijalne posledice sadašnjeg zooantroponotičnog HPAI H5N1 virusa, koji je semi-pandemičan kod ptica, zahteva usklađeno, mudro i precizno delovanje naučnika, političara i stanovništva.

## 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 28<sup>th</sup>-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. Klopffleisch 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](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](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/heβδο/ais\\_55.htm](http://www.oie.int/eng/info/heβδο/ais_55.htm) - Accessed 31 october 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.] *Epizootia 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](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 ULO gene of infectious laryngotracheitis (ILT) virus leads to attenuation in chicken, and ULO 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](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](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](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](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](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](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>