Patogeneza in imunologija

Georg Behrens in Matthias Stoll

Prevod: Marko Kovačević

Virus gripe je že dobro poznan po svoji edinstveni lastnosti, da povzroča periodične epidemije in globalne pandemije tekom katerih se v eksplozivni obliki pojavijo akutna febrilna obolenja dihal pri prebivalcih vseh starostnih skupin. Epidemičnemu širjenju virusa gripe sta pripisane dve lastnosti. Prva je zmožnost njegovega pojava in kroženja v živalskih rezervoarjih pri pticah in pri svinjah s pomočjo genetskega reasortiranja ali z direktnim prenosom in nato s širjenjem na ljudi v nepravilnih časovnih presledkih. Druga je hitro in nepredvidljivo antigensko spreminjanje pomembnih imunskih ciljev kadar se nastani v človeku.

Visoka kužnost virusa povzroča visoko stopnjo morbiditete kot tudi že dobro poznano umrljivost. Gripa je zmožna oblikovati takšen potek dogodkov. Virus gripe kot povzročitelj, ki je patogen in kroži v populaciji ljudi, je za človeka poznan najmanj od 16 stoletja (Cox & Kawaoka 1998). Povzroča periodične epidemije febrilnih obolenj dihal v presledkih od 1 do 3 let. V vsakem stoletju se je pojavilo nekaj pandemij, ki so se hitro širile in zajele vse dele sveta zaradi pojava novega virusa proti kateremu celotna svetovna populacija ljudi ni imela imunitete. Značilnost pandemij je njihov pojav izven običajne sezone, izjemno hiter prenos bolezni, obstoj sočasnih epidemij po celem svetu in visoka stopnja zbolevanja prebivalstva vseh starostnih skupin spremljana z visoko umrljivostjo celo pri mlajših odraslih zdravih osebah. Upoštevajoč naraščanje števila prebivalcev sveta, mednarodni transport in turizem, grozeče epidemije gripe pridobivajo potencial še bolj hitrega širjenja. Poglavje je namenjeno opisu patogeneze bolezni in boj virusa in imunskega sistema zaradi boljšega razumevanja ozadja globalne grožnje epidemije.

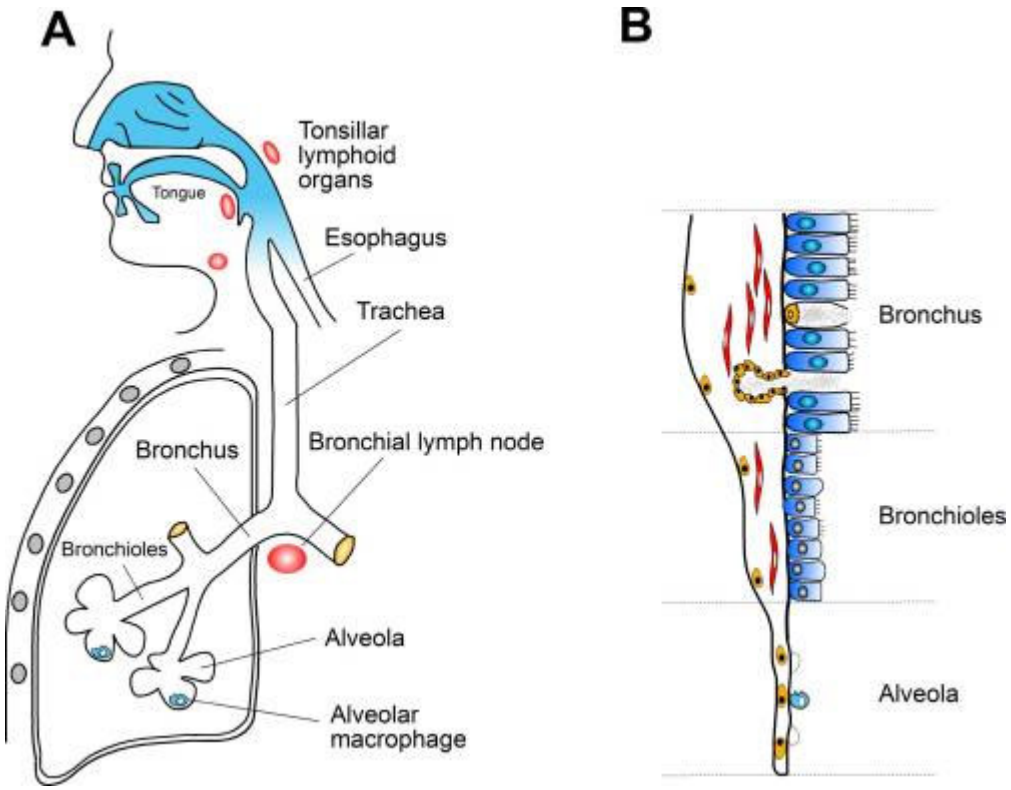
Patogenost in virulenco virusa gripe določa več med seboj sodelujočih dejavnikov:

a. Dejavniki gostitelja:
    - Prisotnost ciljnih receptorjev na celicah gostitelja
    - Uporabnost encimov v celicah gostitelja, ki so bistveni za vstop virusa v celico in za razmnoževanje virusa
    - Stanje imunske sposobnosti posameznega gostitelja
    - Specifična imunost proti specifičnim virusnim epitopom v posameznem gostitelju in v ciljni populaciji
    - Zmožnost imunskega sistema, da učinkovito obvlada razmnoževanje virusa, brez da s svojim inflamatornim odgovorom povzroči kolateralne škode za gostitelja
b. Dejavniki virusa:
    - Zmožnost da se veže za celice gostitelja
    - Zmožnost prenosa virusa
    - Omejitev citopatogenih učinkov tako, da doseže ustrezno ravnovesje med razmnoževanjem virusa in obvladovanjem s strani gostitelja
    - Izogibanje imunskemu nadzoru z evolucijo antigenskih variacij, ki ga vodi selektivni pritisk imunskega odgovora
    - Izogibanje imunskemu nadzoru s pomočjo rekombiniranja z različnimi sevi virusov, ki izvirajo iz bolezni za katerimi zbolijo živali
    - Prilagajanje imunskemu odgovoru tako, da zmanjša učinkovitost mehanizmov obrambe gostitelja

Vstop virusa: Kako virus vstopi v gostitelja?

Prevladujoči način prenosa virusa gripe z osebe na osebo je z aerosola in kapljic. Torej gripa vstopa v gostitelja skozi dihala. V pljučih človeka obstaja okrog 300 milijonov terminalnih vrečk imenovanih alveoli, ki imajo nalogo izmenjave plinov med vdihnjenim

zrakom in krvjo. Celotni prostor za vsrkavanje v pljučih človeka znaša od 80-120 m^2. Stopnja ventilacije pri počivajočem človeku znaša okrog 6 litrov zraka na minuto. Ob tem vdihne veliko število tujih delcev in razpršenih kapljic, ki lahko vsebujejo viruse. Odlaganje tujih delcev je odvisno od njihove velikosti. Inhaliranje zelo majhnih delcev ne povzroča vsrkavanja preko alveolov ali bronhialnega sistema. Majhne kapljice premera 1 do 4 μm se usedejo v drobnih dihalnih poteh. Veliko večji delci lahko ali pa sploh ne vstopijo v dihalni sistem, ampak se odlagajo v zgornjih dihalih (Slika 1A).
Obstajajo številni obrambni mehanizmi gostitelja, vključujoč mehanske ovire, ki ovirajo okužbo dihal. Dihala so pokrita z mukociliarno plastjo, ki se sestoji iz ciliarnih celic, iz celic, ki izločajo sluz in iz žlez (Slika 1 B). Tuji delci v nosni votlini ali v zgornjih dihalih se ulovijo v sluz, le-ta jih vrača nazaj v žrelo in se jih pogoltne. Iz spodnjih dihal tuje delce poganja delovanje ciliarnih in epitelnih celic. V alveolih, ki nimajo cilije niti sluzi, so za uničenje tujih delcev zadolženi makrofagi (Slika 1).

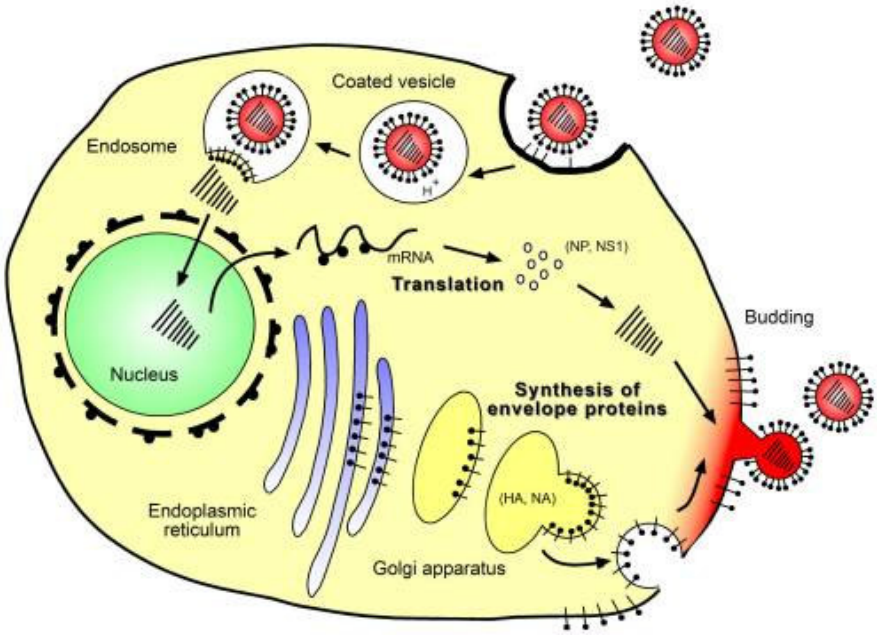


Slika 1. Mesta vstopanja virusa gripe v dihala. (A) Anatomske in funkcijske strukture človekovih dihal. Gripa najprej okuži zgornje dihalne poti in ciliarne celice v bronhijih in v bronhiolah. Klinični sindrom okužbe zajema traheitis, bronhitis, bronhiolitis in bronhopnevmonijo. Adaptacijski imunski odgovor se začne v limfnih bezgavkah, ki so vzdolž dihalnih poti. (B) Epitel dihal je posebej opremljen za obrambo pred nastopajočimi patogeni s slojem sluzi (bronhiji), ciliarnih celic (bronhi in bronhioli) in z alveolarnimi makrofagi (alveoli).

Vezanje za celice gostitelja

Glavna tarča virusa gripe so stebraste epitelne celice dihal. Celice so lahko občutljive na okužbo, če je prisoten in delotvoren in funkcionalen receptor virusa. Torej determinante za tropizem so virusni receptorji. Vendar je ta poenostavljeni model nezadosten za pojasnitev virusnega tropizma, kajti razporejenost receptorjev pri gostitelju je splošno bolj razširjena kot je ugotovljeni virusni tropizem.
Pri okužbi z gripo, konec za vezavo receptorja virusnega hemaglutinina (HA) rabi za vezavo na zunanji strani celice gostitelja prisotnost galaktoznega konca sialične kisline (Weis 1988). Določeni deli povezovalnega konca HA pri različnih podtipih virusa gripe so zelo ohranjeni in nespremenljivi znotraj posameznih podtipov (Daniels 1984). Gostitelj lahko prepreči pripenjanje virusa z različnimi mehanizmi: (1) specifični imunski odgovor in izločanje specifičnih IgA protiteles, (2) nespecifični mehanizmi kot je mukociliarno čiščenje ali izločanje mukoproteinov, ki se vežejo na virusni hemaglutinin in (3) genetično

spreminjanje gostiteljevega receptorja (sialična kislina), ki je visoko konzervativna-nespremenljiva pri isti vrsti toda je različna med ptičjimi in humanimi receptorji (Matrosovich 2000). Rezultat tega je, da mora ptičji virus mutirati hemaglutinin na koncu za vezavo z receptorjem, da bi s tem prebil interspeciesno oviro med pticami in ljudmi. Pri svinjah je v tkivih prisoten sočasni polimorfizem vrst sialične kisline in vezave za galaktozo za ljudi in za ptice. Zaradi tega je pri svinjah možen pojav sočasne okužbe s ptičjim in s humanim virusom gripe, kar omogoča genetsko reasortiranje antigenskih lastnosti obeh vrst virusov v sočasno okuženih celicah. Nedavno so dokazali, da so se nekateri virusi ptičje gripe pri človeku in pri pticah zmožni vezati za različne ciljne celice (Matrosovich 2004). To pojasnjuje ugotovitev več primerov prenosa ptičje gripe, ki so se pojavili od konca 1990-tih direktno s perutnine na ljudi. Virus H5N1 in nekateri drugi podtipi virusa gripe A so se zmožni vezati za receptorje v očesu človeka (Olofson 2005).
Enako kot je pomembna vezava virusa gripe je pomembna tudi njegova ločitev od veznega konca celice gostitelja. Ločitev je funkcijska naloga virusne nevraminidaze (Chen 1998). Virulenca virusa gripe je odvisna od kompatibilnosti nevraminidaze s hemaglutininom. Virulenčni virus, katerega hemaglutinin je mutiral, potrebuje kompenzatorne mutacije pri nevraminidazi, da bi obdržal svojo virulenčnost (Baigent & McCauley 2003, Hulse 2004). Kot posledica tega je bilo ugotovljeno pri virusih resistenčnih na inhibitorje nevraminidaze, da se jim je zmanjšala sposobnost in virulenčnost (Yen 2005).
Kadar sta celična ovojnica in virus tesno drug ob drugem, se ta kompleks endocistira. Z importiranjem H^+ ionov v endocistične vrečke se ustvari kislost notranjosti vrečk. Zaradi kislosti virusni HA pretrpi prilagoditveno preurejanje, kar povzroči izločanje fusiogeničnega proteina. Zaviti region HA postane še bolj zavit, kar povzroča še boljše približanje virusne in endosomske ovojnice tako, da je omogočena združitev. Da se omogoči sproščanje virusne RNA v citoplazmo, se skozi M2 ionske kanale v virionovo notranjost včrpavajo H^+ ioni. To po združitvi virusne in endosomske membrane povzroča disociiranje virusne RNA iz M1 tako, da se prekinejo interakcije med M1 in ribonukleinskim kompleksom, ki so občutljive na nizek pH. Nato se na ATP-odvisen način virusna RNA na importira v jedro, v katerem bo opravljena transkripcija in translacija (Flint 2004).



Slika 2: Replikacijski ciklus virusa influence A. Vezanje in vstop virusa, združitev z endosomsko membrano in sproščanje virusne RNA, razmnoževanje v jedru, sintetiziranje struktur in proteinov ovojnice, budding-poganjanje in sprostitev virionov zmožnih okužiti sosednje epitelne celice (Prilagojeno iz Cox & Kawaoka 1997)

Kje nastane primarna replikacija?

Za nastanek zrele virusne partikule je pogosto potrebna prisotnost celične proteaze, ki razcepi virusne proteine. Torej na mesto repliciranja virusa razen vstopnih receptorjev lahko vplivajo še dodatni dejavniki. Pri človeku je replikacija virusa gripe v principu omejena na epitelne celice zgornjih in spodnjih dihal. Razlog temu je omejenost izločanja serin proteaze, triptaze Clara, ki jo izločajo neciliarne Clara celice bronhialnega epitela. Prečiščeni encim razcepi polipeptidno verigo HA prekursorja H0, ki je v ekstracelularnih delcih in aktivira HA v virionih ter jim s tem povrne kužnost. Nekateri visoko virulenčni sevi ptičje gripe vsebujejo genetske vstavke na razcepitvenem koncu HA, kar omogoča obdelovanje z vseprisotnimi proteazami. To verjetno povzroča spremembo tropizma in dodatne druge lokacije za repliciranje pri živalih in pri človeku (Gamblin 2004). Tkivni tropizem ptičje gripe (H5N1) pri človeku ni popolnoma razjasnjen. V enem primeru je bila s pomočjo reakcije reverzne transkripcije polimerazne verige ugotovljena prisotnost virusne RNA v pljučih, v črevesju in v vranici. Toda pozitivno zvita virusna RNA, ki kaže na replikacijo virusa, je bila omejena izključno na pljuča in črevesje (Uiprasertkul 2005). Torej je replikacija virusa H5N1 pri človeku verjetno omejena na respiratorni in na digestivni trakt, za razliko od dokumentiranih diseminiranih okužb pri drugih sesalcih in pri pticah.

Kako se okužba širi v gostitelju?

Kadar gripa učinkovito okuži respiratorne epitelne celice se v nekaj urah virus začne razmnoževati in nastanejo številni virioni. Kužni delci se prednostno sproščajo z apikalnega konca plazma membrane epitelnih celic v dihalne poti s pomočjo procesa imenovanega budding-poganjanje. S tem se pospeši hitro širjenje virusa znotraj pljuč zaradi hitrega prenosa okužbe na sosednje celice.

Spremembe na pripenjalnem koncu HA zaradi naravno ponavljajočih se mutantov lahko dramatično vpliva na tropizem in na patogenost gripe. To je možno ugotoviti po ostalih celičnih proteazah. S tem lahko obrazložimo dejstvo, da so številni s ptičjo gripo (H5N1) okuženi posamezniki v Hong Kongu imeli gastrointestinalne, simptome s strani jeter in ledvic, kot tudi respiratorne simptome, in zakaj so bili virusi, ki so izvirali iz teh bolnikov nevirulenčni za miši (Park 2002). Ostalo je nepojasnjeno ali so simptomi rezultat hematogene širitve ali pa odražajo nepljučne načine vstopa virusa v gostitelja. Vendar pantropično naravo gripe lahko delno pojasnjuje mutiranje NA. Npr. laboratorijsko dobljen sev WSN/33 gripe, ki je varianta prvega humanega virusa doslej izoliranega, se za razliko od večine humanih sevov gripe lahko razmnožuje in vitro brez prisotnosti in brez dodajanja tripsina. V tem virusu omejena delecija, ki odstrani glikolizacijski konec na rezidui 46 NA omogoča nevraminidazi, da se veže in da sekvestira plazminogen. To povzroči višjo lokalno koncentracijo tega prekursorja ubikvitarne proteaze in s tem poveča cepljivost HA. To kaže na načine s pomočjo katerih virusi gripe A in mogoče drugi virusi lahko postanejo visoko patogeni za ljudi (Goto & Kawaoka 1998). Raziskave genetsko rekonstruirnega pandemičnega seva virusa španske gripe iz l. 1918 (H1N1) so odkrile dodatne mehanizme za z NA-posredovano razcepitev HA, ki so mogoče pomembni za razmnoževanje in za virulenčnost tega virusa (Tumpey 2005).

Končno so raziskave na živalih pokazale, da mesto inokulacije lahko določa pot-način širjenja virusa gripe v gostitelju. Npr., nevrotropni NWS sev se razseje v možgane s hematogenim širjenjem, kadar se ga inokulira intraperitonealno, toda v centralno živčevje dospe preko senzornih nevronov kadar virus inokuliramo skozi nos (Flint 2004). Zadnji način je dokazan tudi za virus H5N1 Hong Kong (Park 2002).

Kakšen je začetni odgovor gostitelja?

Čeprav je bolezen pogosta, še vedno pri gripi človeka niso popolnoma znani načini specifičnega inflamatornega odgovora ali regulacija imunskega odgovora niti patogeneza citopatoloških učinkov. Večina dejstev je dobljenih na raziskavah na živalih, pri katerih je ptičja gripa razširjena bolezen. Patofiziologija takšnih modelov se lahko zelo razlikuje od patofiziologije pri človeku.

Citokini in vročina

Glavno vprašanje je, kako okužba, ki je v bistvu omejena na respiratorni trakt, lahko povzroči takšne težke splošne simptome. Kot je to pri številnih drugih nalezljivih boleznih gre se za nespecifični in adaptacijski imunski odgovor, ki bistveno prispeva h kliničnim znakom in simptomom gripe in končno k obvladovanju okužbe. Imunski mehanizmi lahko povzročijo lokalne kot tudi sistemske učinke. Citokini, ki jih po okužbi hitro izločajo epitelne in imunske celice respiratorne sluznice, so lokalni hormoni, ki aktivirajo celice posebej pa celice znotraj imunskega sistema. Kemokini so podskupina citokinov, ki delujejo kot kemoatraktanti za celice imunskega sistema. Npr. okužba za gripo pri človekovih plazmocitnih in pri mieloidnih dendritičnih celicah povzroča program izločanja kemokinov, ki omogoča koordinirani priklic različnih imunskih dejavnikov (Piqueras 2005, Schmitz 2005). Najbolj pomembni citokini služijo kot endogeni pirogeni in so vključeni v patogenezo vročice: IL-1α/β, TNF α/β, IL-6, interferon (IFN) α/γ, IL-8 ter makrofagni inflamatorni protein (MIP)-1α.

Prisotnost večine teh citokinov je bila ugotovljena v nosno- žrelnih brisih ljudi, ki so bili okuženi za gripo eksperimentalno ali po naravni poti (Brydon 2005). Obstaja mnenje, da citokini, ki nastanejo lokalno ali sistemsko po interakciji z eksogenimi pirogeni (npr. gripa) v centralno živčevje prispejo skupaj s fagociti. V hipotalamusu je del imenovan Organum vasculosum laminae terminalis, ki ima znižano krvno-možgansko bariero in omogoča prehod pirogenov. Na tem mestu pirogeni na od doze odvisen način povzročajo produkcijo prostaglandinov, posebej pa prostaglandina E_2. Ti mediatorji povišajo termostatsko točko in sprožijo termoregulacijske mehanizme, da se poveča telesna temperatura. Dejstvo, da nobeden od zgoraj omenjenih citokinov pri gripi ni v korelaciji s težo bolezni, kaže v prid njihovi pleiotropiji in navskrižnosti med potmi signalov.

Pomembnost citokinov je različna pri različnih sevih virusa gripe in je različna pri posameznikih. Pri okužbi za gripo s sevom H5N1 Hong Kong H5N1 iz l. 1997 so predlagali, da ta povzročitelj povzroča močno proinflamatorne citokine (posebej TNFα) s pomočjo produktov NS gena (Cheung 2002, Lipatov 2005, Chan 2005). Pri raziskovanju in identificiranju ostalih komponent viriona, ki povzročajo sproščanje citokinov je bilo ugotovljeno, da je dvojno zasukana (ds) RNA, izolirana iz pljuč miši kot tudi sintetizirana, pirogena, kadar se jo vbrizga v CNS ventrikel miši. Takšno dsRNA sproščajo okužene celice ob njihovem umiranju in na ta način stimulirajo produkcijo citokinov. Nedavne študije kažejo, da se v epitelnih celicah pljuč ustvarja Toll-like receptor (TLR) 3, ki zaznava dsRNA. Ugotovljeno je, da TLR3 neposredno prispeva k imunskem odgovoru respiratornih epitelnih celic (Guillot 2005, Akira & Takeda 2004). Verjetno je, da je začenjanje naravnega imunskega odgovora proti gripi pri človeku odvisno od zaznavanja enojno zasukane-zvite RNA, preko TLR 8, ne pa preko detekcije dsDNA s TLR 3. Vročino lahko povzročijo tudi virusni delci kot virosomi brez RNA, ki vsebujejo le virusni lipid, hemaglutinin in nevraminidazo. Posamezne virusne komponente, ki niso pirogene verjetno pojasnjujejo dejstvo, da cepivo iz celotnega virusa lahko povzroči gripi podobne simptome, medtem, ko cepiva iz podenot tega ne povzročajo (Brydon 2005).

Respiratorni simptomi

Pri gripi so običajni pojav hiperreaktivnost bronhialnega sistema (Utell 1980, Little 1978), obstrukcija v glavnem drobnih respiratornih poti (Hall 1976) in poslabšana zmožnost difuzije (Horner 1973). Hiperreaktivnost in obstrukcija bronhijev lahko traja dlje časa posebej pri alergijskih boleznih (Kondo & Abe 1991) in imajo kot izid nastajanje pro-inflamacijskega citokinskega profila, ki moti zmožnost nastajanja tolerance na aerosolizirane alergene (Tsitoura 2000).

Pri okužbi s humano gripo je zelo redek pojav težke inflamacije alveol, ki se kaže kot primarna virusna pljučnica. Običajno se kaže kot razširjeno vnetje spodnjega in zgornjega respiratornega trakta, z izgubljanjem ciliarnih celic, kar vodi k nastajanju hiperemičnih ali hialinskih membran in infiltracijo z nevtrofilnimi in z mononuklearnimi celicami (Yeldandi & Colby 1994).

Za razliko od primarne virusne pljučnice je pri humani gripi pogosta bakterijska superinfekcija, ki povzroča resno obolevnost in umrljivost v glavnem pri starejših odraslih osebah. Ugotovljenih je bilo več dejavnikov, ki bi lahko pojasnili povečano tveganje za nastanek bakterijske okužbe respiratornega trakta. Mednje sodijo poškodovanost kolumnarnin epitelnih celic s prekinitvijo epitelno celične ovire (Mori 1995), zmanjšano mukociliarno čiščenje (Levandovsi 1985), povečanje adherence bakterij (McCullers 2002) in funkcijska poškodba nevtrofilov (Abramson 1986, Cassidy 1988).

Citopatološki učinki

Humana gripa vodi k istovrstnim citopatološkim učinkom, ki so večinoma na kolumnarnih epitelnih celicah dihal, kar rezultira z nastankom akutne bolezni pljuč in dihalnih poti. Okužba in razmnoževanje virusov gripe v celicah dihal povzroča poškodbo, ki jo povzroči zmanjšana regulacija sinteze proteinov v celicah gostiteljic (Katze 1986, Sanz-Esquerro 1995) in apoptoza (Wiley 2001a). Apoptoza, ki je imenovana programirano uničenje celice, je serija definiranih celičnih dogodkov, ki ima na koncu za izid učinkovito odstranjevanje celice in njene vsebine. Apoptozo lahko sprožijo različni mehanizmi, spremljajo jo morfološke spremembe, vključujoč prekinitev citoskeletona, kondenziranj plazme in kromatina, izguba mitohondrijske funkcije, fragmentiranje DNA in končno oblikovanje majhnih z membrano ovitih delcev, znanih kot apoptotska telesca, ki jih počistijo fagocitarne celice kot so makrofagi in dendritične celice.
Apoptozo, ki jo sproži virus gripe, uravnavajo Fas-posredovani mehanizmi in Fas-neodvisni signali, kot je s protein kinazo R (PKR) tvorba kompleksa FADD/caspase-8, ki začenja kaskado caspase. PKR je ključna regulacijska sestavina številnih apoptotičnih poti in jo sproža IFN, aktivira pa jo dsDNA (Brydon 2005). Kot tretjo pot k apoptozi gripa prek virusne nevraminidaze aktivira transformacijski faktor rasti (TGF)-β. NA lahko aktivira latentni TGF-β na površju celice tako, da olajšuje prehod TGF-β v njegovo aktivno obliko. TGF-β začenja signalno kaskado, kar povzroča aktiviranje c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) ali s stresom aktivirane protein kinaze (SAPK). Rezultat je aktiviranje faktorjev transkripcije in povečanje nastajanja pro-apoptotičnega gena. Ta pot, skupaj z učinki na stabilnost majhnega proteina na mitohondrijski membrani, ki ga kodira alternativni +1 reading okvir v proteinu PB1 (Chen 2001), je bila povezana z apoptozo limfocitov in lahko pojasnjuje limfopenijo ugotovljeno tekom akutne okužbe.
Poškodba tkiva pljuč, ki nastane z okužbo z virusom gripe, je povezana z oksidativnim stresom celic, z nastajanjem reaktivnih vrst kisika (ROS) in s sprožitvijo sintetaze-2 dušikovega oksida , ki vodi k formiranju toksičnih reaktivnih dušikovih intermediatov. Vendar so antioksidanti imeli majhen učinek na apoptozo v linijah bronhiolarnih celic *in vitro*.

Simptomi H5N1 okužb

Ptičja gripa je nalezljiva bolezen ptic, ki jo povzročajo sevi virusa gripe tipa A. Do sedaj so bile vse epidemije visoko patogene oblike povzročene z virusi gripe A podtipov H5 in H7. Za sedaj ni znano ali ima ptičja gripa pri ljudeh (H5N1) enake citopatogene učinke, kot so že omenjeni učinki. Izvedenih je bilo le nekaj raziskav na težkih ali na smrtnih primerih. Možna je brez simptomna oblika ali oblika bolezni z blagimi bolezenskimi simptomi (Buxton Bridges 2000, Katz 1999). Incidenca takšne oblike je podcenjena.
Najpogostejši začetni simptomi gripe H5N1 pri človeku so visoka vročina in pri pacientih, ki so se obrnili za pomoč v bolnišnico, pljučnica, faringitis, simptomi s strani prebavil, konjunktivitis in akutni encefalitis (Yuen 1998, Tran 2004, Yuen & Wong 2005). Pri odraslih pacientih, ki so imeli začetne znake pljučnice je bolezen pogosto napredovala v ARDS-podobno bolezen. Pri smrtnih primerih H5N1-gripe, so kot vodilo opisali reaktivni hemofagocitni sindrom. Opisane pljučne težave so organizirana difuzna poškodba alveol in intersticijska fibroza. Od izven pljučnih manifestacij so opisani obsežna centralno lobularna nekroza jeter, akutna tubularna nekroza ledvic in limfoidna deplecija (To 2001). Prisotnost virusov v spremembah niso dokazali z izolacijo, z reakcijo verige reverzne transkriptivne polimeraze niti z imunskim barvanjem. Povečani so solubilni interleukin-2 receptorji, interleukin-6 in interferon-gamma. Poleg tega je v pljučnih tkivih pri drugih osebah

zbolelih za gripo H5N1, ugotovljena prisotnost dejavnik tumorne nekroze alfa mRNA (Uiprasertkul 2005).
V primerjav s humanimi virusi H1N1 (Hayden 1998) je za sev Hong Kong H5N1 iz l. 1997 ugotovljeno, da mogoče s produkti NS gena sproži pro-inflamatorne citokine, vključujoč IL-10, IFNβ, RANTES, IL-6 ter posebej TNFα (Cheung 2002, Lipatov 2005, Chan 2005).
Avtorji teh študij so postavili hipotezo, da pri smrtnih okužbah ljudi s ptičjim H5N1 podtipom začetno razmnoževanje virusa sproži hipercitokinemijo, ki jo zaplete reaktivni kemofagocitni sindrom. Ta sindrom ima pri okužbi z običajnimi humanimi podtipi patogenezo, ki je različna pri okužbi s ptičjim podtipom H5N1 (To 2001). Pri primerih okužbe s ptičjim H5N1 s smrtnim izidom ni bila ugotovljena bakterijska superinfekcija (To 2001). Ta ugotovitev utegne biti pristranska zaradi zgodnjega smrtnega izida pri najtežjih zbolelih, ker ni bilo časa za razvoj superinfekcije.

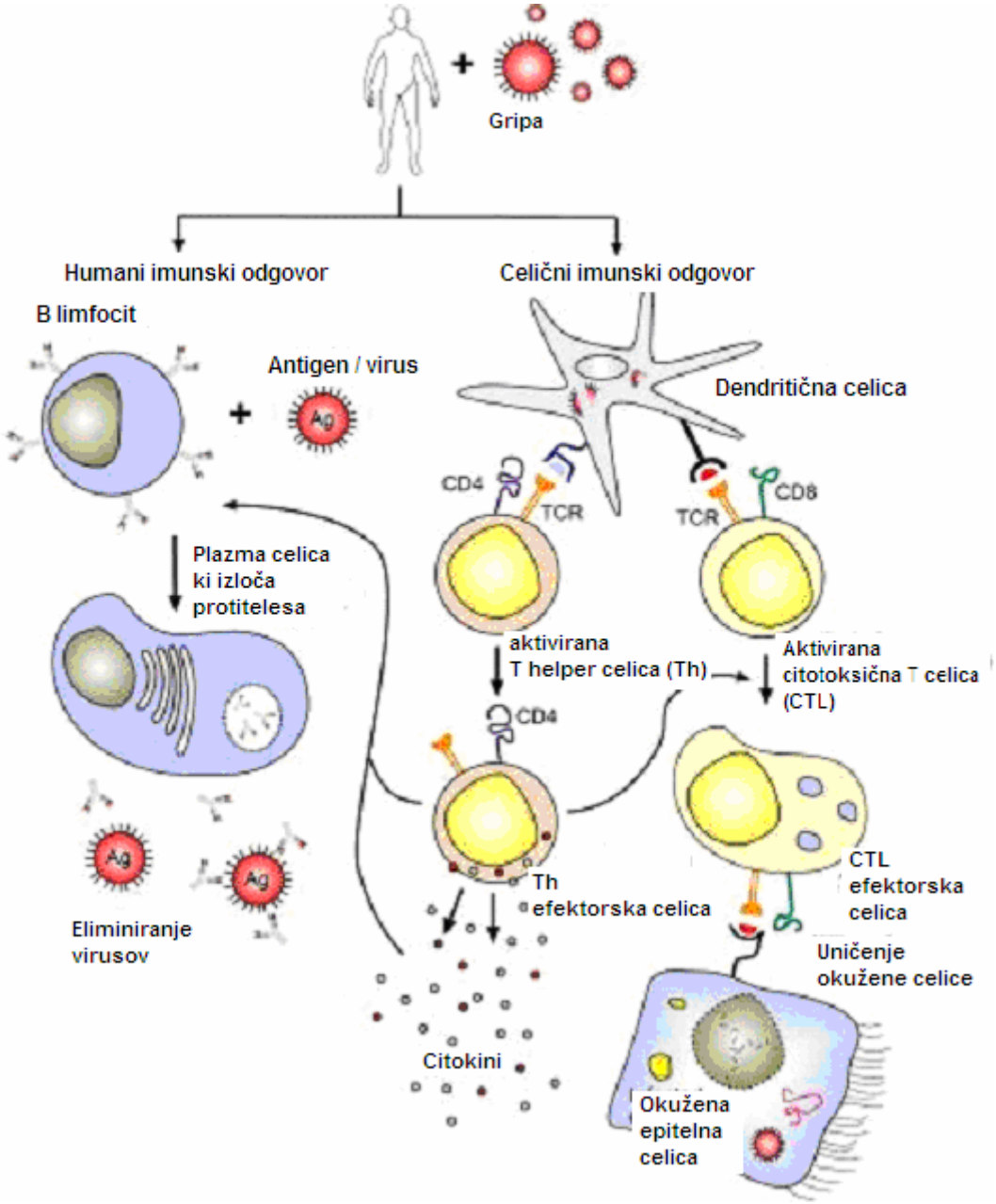
Kako se gripa prenaša na druge?

Prenos po respiratorni poti je predvsem odvisen od produkcije delcev in aerosola, ki vsebujejo viruse. Aerosoli nastanejo tekom govora in pri normalnem dihanju. Za izločanje iz nosne votline je potrebno kihanje in je zelo učinkovito, če okužba povzroča sekrecijo iz nosu. S kihanjem nastane do 20.000 kapljic, s kašljanjem le nekaj sto. Največje kapljice padejo na tla že po nekaj metrih. Ostale kapljice potujejo na razdalje, ki so sorazmerne njihovi velikosti. Kapljice premera 1-4 µm lahko ostanejo suspendirane v zraku dolgo časa in prispejo v spodnja dihala. Ekperimenti prenosa gripe pri prostovoljcih so pokazali, da je bronhialna inhalacija majhnih kapljic prednostna, v primerjavi z inokulacijo velikih kapljic v zgornja dihala ali v konjunktivo (Alford 1966, Little 1979, Bridges 2003). Če se virus začne razmnoževati zgodaj, v spodnjih dihalih nastajajo manjše kapljice, ki vsebujejo večje število virusov in so bolj kužne, kajti ni se še vzpostavil specifični imunski nadzor. Prenos H5N1 z živali na človeka je mogoč na različne načine z direktnim (kot z indirektnim) kontaktom z okuženo perutnino.
Za nastanek epidemije gripe A je nujna visoka stopnja obolevnosti. Zaradi tega epidemije v zimskem obdobju v Evropi in v severni Ameriki pojasnjujejo s tesnejšimi stiki in z bivanjem ljudi v manj prezračevanih prostorih. Virus gripe je zelo dobro prilagojen: iz neznanih razlogov je zmožen najbolje preživeti na nižji relativni vlažnosti in na nižjih zunanjih temperaturah (Hemmes 1960). Ptičja gripa (H5N1) utegne biti manj prilagojena na prenos s kapljicami: ikubacijska doba je daljša (Chotpitayasunondh 2005), kar povzroča v epidemiji teoretično manj sočasni začetek pojava bolezni pri številnih osebah. Razmnoževanje v črevesju in prebavni simptomi se pojavijo prej kot respiratorni, celo do teden dni prej (Apisarnthanarak 2004), kar omogoča začenjanje specifičnega imunskega odgovora preden se virus začne širiti s kužnimi kapljicami. Posledica tega je, da je razmnoževanje virusa ptičje gripe manjše v nazofarinksu kot je to pri humani gripi (Peiris 2004), toda razmnoževanje je podaljšano (Beigel 2005). Do sedaj je prenos H5N1 med ljudmi redek (Buxton Bridges 2000, Ungchusak 2005) in bi rekli, da je neučinkovit. V zaključku virus ptičje gripe (H5N1) verjetno zahteva več pasaž-prehodov, da bo zmožen prenosa s človeka na človeka in da končno doseže stopnjo kužnosti, ki bo dovolj učinkovita, da povzroči epidemijo ali pandemijo.

Imunologija

Gripa povzroča akutno okužbo gostitelja in sproži kaskado imunskih reakcij, ki aktivirajo skoraj vse dele sistema imunske obrambe. Večina začetnega prirojenega odgovora vključuje sproščanje citokina (IFNα/β), dotok nevtrofilnih granulocitov ali naravnih celic ubijalk (Mandelboim 2001, Achdount 2003) ter aktiviranje celic, kar je odgovorno za akutni pojav kliničnih simptomov. Naravna imuniteta – odpornost je bistveni predpogoj za adaptacijski imunski odgovor. Prvič omejuje začetno razmnoževanje virusa in breme antigenov. Drugič aktivira za antigen specifične limfocite iz adaptivnega imunskega odgovora z molekulami, ki so nastale na celicah naravne imunosti tekom njihove interakcije z virusi (Slika 3). Virusi, da bi nasprotovali in premagali celični odgovor z IFN α/β, sprožijo mehanizme za ustvarjanje nestrukturnega proteina 1 (NS1). NS1 je verjetno

sekvester virusne dsRNA, ki celičnim senzorjem preprečuje prepoznavo nevarne molekule in s tem tudi sprožitev sproščanja IFN α/β (Garcia-Sastre 1998, Garcia-Sastre 2005). Za nastajanje adaptivnega imunskega odgovora je potrebno nekaj dni. Tedaj začne učinkovati tako, da pomaga v brzdanju širjenja virusa, eradicira virus in na koncu ustvari spominski odgovor za dolgoročno odpornost na ponovne okužbe s homolognim virusom. Le redko je ugotovljena navzkrižna zaščita znotraj podtipov virusov gripe. Okužbe v bistvu ne povzročajo nobene zaščite po podtipih ali med tipi A in B (Treanor 2005). Okužba za gripo sproži nastajanje sistemskih in lokalnih protiteles (humoralna imunost), kot tudi odgovor s citotoksičnimi T celicami (celična imuniteta). Vsaka od njih je pomembna za ozdravitev od akutne bolezni in za odpornost na ponovne okužbe.



Slika 3. Humoralni in s celicami posredovani imunski odgovor na okužbo z virusom gripe. Humoralna veja imunskega sistema se sestoji iz B-limfocitov *(levo)*, ki po se interakciji z gripo diferencirajo v plazma celice-plazmatke, ki izločajo protitelesa. Celični odgovor *(desna)* se začenja s predstavitvijo antigena prek MHC I (črna) in II (modra) molekul iz dendritičnih celic, ki nato povzroča aktivacijo, proliferacijo in diferenciranje antigen-specifičnih T celic (CD4 ali CD8). Te celice pridobijo funkcijo efektorskih celic, da lahko direktno pomagajo pri sproščanju citokinov ali da posredujejo citotoksično po prepoznavi antigena (Prirejeno iz Flint 2004). Ni prikazano nastajanje celicnega spominskega imunskega odgovora in različne oblike naravne imunitete povzročene z gripo.

Humoralni imunski odgovor

Protitelesa (npr. IgG, IgA) izločajo plazma celice-plazmatke, kar je finalna faza razvoja B celic. V tej fazi so B celice prepoznale antigen, so bile stimulirane s strani CD4 T celic in iz T celic izvirajočih citokinov (Slika 3). Za razliko od T celic so B celice zmožne prepoznati antigen v njegovi naravni obliki. Specifičnost antigena izvira iz naključnih preurejanj genov, ki upravljajo s hipervariabilnim regionom imunoglobulinov v celicah medtem, ko so še v kostnem mozgu. Neizkušene B celice nato vstopajo v cirkulacijo in s krvjo in z limfotokom potujejo skozi tkiva in limfoidne organe. V limfnih bezgavkah neizkušene B celice prepoznajo isto izvoren antigen preko protiteles, ki so na zunanjosti celic, se aktivirajo in preidejo iz proizvajanja IgM na proizvajanje IgG (klasni preklop). Ob tem se jim poveča njihova imunoglobulinska specifičnost in afiniteta ter se preoblikujejo v plazmatke ali v spominske B celice s svojo delitvijo v prisotnosti citokinov. Imunoglobulini IgA se transportirajo skozi sluznični epitel zgornjih dihal, kjer služijo za nevtraliziranje in čistijo virusno okužbo. Imunoglobulini IgG so prvenstveno odgovorni za zaščito spodnjih dihal (Palladino 1995, Renegar 2004).

Okužba za gripo kot izid povzroča sistemsko produkcijo protiteles proti gripinim glikoproteinom HA in NA kot tudi proti M in NP proteinom. Npr., HA specifični imunoglobulini vključujoč IgM, IgA in IgG se pojavijo znotraj 2 tednov po inokulaciji virusa. Razvoj anti-NA je vzporeden razvoju protiteles, ki inhibirajo hemaglutinin-inhibitorna protitelesa. Vrhunec titrov protiteles nastane med 4-7 tedni po okužbi in se nato postopoma zmanjšujejo. Protitelesa je možno ugotoviti še leta po okužbi, celo če ni ponovne okužbe. Protitelesa poti HA ščitijo pred zbolevenjem in pred okužbo s homolognim virusom in eden od glavnih ciljev imunizacije s cepivom je ustvarjanje nevtralizacijskih protiteles. Pred okužbo ščitijo serumska HA inhibitorna protitelesa v titru 1:40 ali višjem, ali pa serumska nevtralizacijska protitelesa v titru 1:8 ali višjem. Za popolno zaščito starejših oseb je potreben višji nivo protiteles (Treanor 2005).

Za razliko od protiteles proti HA protitelesa proti NA ne nevtralizirajo kužnosti virusa, namesto tega zmanjšujejo učinkovito sproščanje virusa iz okuženih celic (Johansson 1989). Razlog za to je, da neuraminidaza razcepi rezidue sialične kisline na celičnih receptorjih, na katere se prejmejo novo oblikovani delci. Protitelesa proti NA lahko ščitijo pred boleznijo, rezultat njihovega delovanja je zmanjšanje izločanja virusa in resnosti simptomov bolezni. Podobne učinke naj bi imela protitelesa proti M2 proteinu virusa gripe A, čeprav splošno protitelesa proti notranjim antigenom niso nevtralizacijska, bolj hitro izginejo in verjetno nimajo vloge v zaščitni imunosti.

Imunski odgovor sluznice proti gripi so merili v sekreciji iz nosu. Odgovor je značilen po prisotnosti IgA in IgG_1 proti HA. Nivoji sluzničnih anti-HA IgG so v dobri korelaciji z nivoji imunoglobulinov v serumu, kar kaže na pasivno pronicanje iz sistemskih predelov. Imunoglobulini IgA nastajajo lokalno. Raziskave kažejo, da je odpornost pred ponovno okužbo v glavnem posredovana z lokalno nastalimi HA specifičnimi IgA, čeprav bi enako tako lahko bili pomembni tudi IgG (Renegar 2004). Ne glede na to ali protitelesa izvirajo iz sluznic ali pa so sistemska, če so v zadostnih koncentracijah, so sama zmožna ščititi. Optimalna zaščita nastane takrat, ko so prisotna obojna serumska in protitelesa iz nosne sluznice (Treanor 2005). V imuniteti proti gripi protitelesa delujejo z nevtralizacijo virusa ali pa z uničevanjem okuženih celic preko celične toksičnosti sprožene s sistemom komplementa ali s protitelesi.

Gostitelji, ki preživijo akutno virusno okužbo in se znebijo virusa, so na sploh imuni na okužbe z istim virusom. Ne glede na to se akutne okužbe, ki jih povzroča virus gripe ponovno pojavljajo klub aktivni imunski oviri. Razlog je v tem, da gripa igra strukturno plastičnost tako, da je zmožna v svojih strukturnih proteinih prestati številne zamenjave aminokislin, brez da se ji zmanjša infektivnost. Kot primer molekul HA za vezavo z receptorjem s sialično kislino, ki je odgovoren za vstop virusa v ciljno celico, je tudi glavna tarča za nevtralizacijska protitelesa in za citotoksične T-limfocite. To kaže na neprekinjeni imunološki pritisk. Ta imunska selekcija ali pestrost, ki nastaja iz popravljanja napak rahlo variira HA v času. Te variacije omogočajo, da se virus izogne humanemu imunskem odgovoru (antigenski drift). Te spremembe so razlog za vsakoletno epidemično širjenje gripe in za potrebe po oblikovanju in izdelovanju novega cepiva za vsakoletno epidemijo.

Nasprotno temu je antigenski šift velika sprememba zunanjih proteinov viriona, kajti geni programirajo popolnoma nove zunanje proteine. To je lahko povzročeno z rekombinacijo ali z reasortiranjem genoma ali segmentov genoma. Antigenski drift je možen vsakič, kadar se genomi replicirajo. Nasprotno temu se antigenski šift pojavi le pod določenimi okoliščinami, kar je relativno redko in je verjetni razlog za pojav pandemij.

Celični imunski odgovor

Dendritične celice imajo dokazano centralno vlogo pri začenjanju in v vodenju odgovora s T-limfociti. Dendritične celice so raztreseno razporejena migratorna skupina levkocitov, ki izvirajo iz kostnega mozga. Specializirane so za razumevanje, transportiranje, obdelovanje in za predstavitev antigenov T-celicam (Slika 3). Osnovni vzorec je, da dendritične celice, ki so nameščene v pljučih pridobijo napadalski patogen. Ob tem se aktivirajo in potem potujejo v lokalne drenažne limfne bezgavke (Legge & Braciale 2003). Vzorec antigena se predela in se ga pritrdi na zunanjost dendritičnih celic v obliki peptidov, ki se predstavijo s pomočjo glavnih kompleksnih histokompatibilnih molekul (MHC) (Silver 1992). V limfnih bezgavkah sedaj že zrele dendritične celice učinkovito sprožijo odgovor s katerokoli od T-celic, ki ima receptor specifičen za tuji-peptidni-MHC kompleks na zunanjosti dendritične celice (Shortman & Liu 2002). Notranje antigene iz okužbe z virusom dendritične celice obdelajo in jih na MHC I molekulah prestavijo CD8 T celicam. Zunanje antigene predstavijo preko MHC II molekul CD4 T limfocitom. Druga možnost je, da dendritične celice pridobljene antigene iz okuženih celic lahko predstavijo z dojemanjem ali s transferom sosednjim dendritičnim celicam v limfni bezgavki, ki potem začne odgovor CD8 T celic s procesom imenovanim stanska predstavitev (Belz 2004, Heath 2004, Wilson 2006). Novo aktivirane T celice pridobijo funkcijo efektornih celic in migrirajo na mesto okužbe v pljučih in tam posredujejo svoje protivirusne dejavnosti (Slika 3).
Po ozdravitvi po okužbi so posledice na stanje imunološkega spomina takšne, da je posameznik zmožen boljše obvladati bodočo okužbo z istim patogenom (Ahmed & Gray 1996). Spomin ohranjajo antigensko specifične T celice, ki so sedaj v povečanem številu, kar zmanjšuje potrebo po sočasnih stimulacijskih signalih, kot je to pri naivnih T celicah. Te se hitro odzivajo na ponovno antigensko stimulacijo (Woodland & Scott 2005). Obstajajo tudi dokazila v prid kopičenja za lokacijo za gripo specifičnih CD8 spominskih T celic. Te se kopičijo v pljučih človeka zaradi takojšnje imunološke zaščite pred ponovno okužbo pljuč (de Bree 2005, Wiley 2001b). Tekom okužbe za gripo reagirata obe podskupini spominskih T celic CD4 in CD8, da bodo posredovale v obvladovanju ponovne okužbe z virusom gripe, kar je ravno obratno dogajanjem pri primarni okužbi, kadar je krčenje odvisno le od CD8 T limfocitov (Woodland 2003).
Drugi pomemben pojav, ki ga je potrebno poudariti pri okužbi za gripo je, da CD4 T limfociti pomagajo B limfocitom, da proizvajajo protitelesa anti-HA in anti-NA (Slika 3). Epitopi na HA, ki jih prepoznajo CD4 T pomagalke, se razlikujejo od epitopov, ki jih prepoznavajo protitelesa. T celice pomagalke (Th) so zmožne tudi pospeševanja generiranja virus specifičnih CD8 citotoksičnih T limfocitov. Te celice se lahko naprej porazdelijo na najmanj Th1 in Th2 celice, kar je odvisno od vrste citokinov, ki jih proizvajajo. Pri miših okužba za gripo povzroča močen odgovor Th1, toda v pljučih okuženih živali so bili ugotovljeni tudi Th2 citokini (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10). Nekatera dokazila so, da je zaščitna imuniteta posredovana z odgovori podobnih Th1. Pri okužbi z gripo CD8 citotoksični T limfociti (CTL) prepoznavajo epitope iz HA ali pa notranje proteine M, NP, ali PB2, ki so predstavljeni na molekulah MHC klase I (Treanor 2005). Odvisno od njihove antigenske specifičnosti so CTL celice lahko podtip specifične ali pa v primeru, da prepoznajo notranje antigene so široko navzkrižno reaktivne z gripo A. Preizkusi na živalih z uporabo posvojenega trasferja CTLjev so tekom okužbe razkrili njihovo proliferiranje in migratorne vzorce (Lawrence & Braciale 2004, Lawrence 2005) ter njihov potencial za posredovanje ozdravitve okužbe z gripo. Vendar za obvladovanje gripe niso brezpogojno nujni.
T limfocitni odgovori so pri človeku na višku okrog 14 dni po okužbi. Nivoji za gripo specifičnih CTL-ov korelirajo z zmanjševanjem trajanja in nivojem razmnoževanja virusa pri odraslih. Spominske CD8 T celice imajo vlogo v izboljšanju ostrosti bolezni in v

pospeševanju pozdravitve pri reinfekciji. Nedavne raziskave na živalih kažejo, da se ponovni odgovor v pljučih sestoji iz več ločljivih faz, ki so časovno in anatomsko ločene. Prva faza je ta, ki jo posredujejo spominske T celice, ki stalno bivajo v pljučnih zračnih poteh (Woodland & Radall 2004). Pomembno je, da so se te celice zmožne odzvati na prve znake okužbe, kadar je število virusov še majhno. Ker se niso zmožne razmnoževati zaradi omejitev v okolju zračnih poti, so zmožne izdelovati citokine, ki omejijo razmnoževanje virusa in njegovo širjenje v epitel. Druga faza reagiranja je posredovana s T celicami, ki se hitro kopičijo v dihalnih poteh že v prvih nekaj dneh reagiranja. Tretja faza je z antigeni vodena ekspanzija spominskih T celic, ki nastanejo v sekundarnih limfnih organih. Te spominske celice se razmnožujejo v limfnih organih več dni in se v pljučne zračne poti nabirajo po 5 dnevih od okužbe (Woodland & Randall 2004). Ni znano ali je sestavljene modele nastale v eksperimetih na živalih možno uporabiti na ljudeh. Vendar je to bistveno za boljše razumevanje vrste imunskih odgovorov in generiranja ter obstoja učinkovitega reagiranja T celic tekom okužbe za gripo v cilju izboljšanja bodočih postopkov cepljenja in oblikovanja cepiv proti gripi.

Zaključek

Spoznali smo se z načinom povzročanja akutnega febrilnega obolenja dihal povzročenega z virusom gripe. Patogenezo zaznamuje hitro razmnoževanje in širjenje virusa v pljučih, kar povzroča lokalno in sistemsko vnetje in sproščanje citokinov. Ti dogodki skupaj z adaptacijskim imunskim odgovorom pomagajo v zmanjševanju števila virusov, eliminiranju virusa in sprožitev ozdravitve. Humoralni in celični imunski odgovori izzvani z okužbo ali s cepljenjem zagotavljajo posameznikom in prebivalstvu dolgotrajno zaščitno imuniteto proti sorodnim sevom virusa. Povzročitelj gripe lahko spodkopava imunost pridobljeno z okužbo ali s cepljenjem s spremembami svojih antigenov – šift ali drift. To lahko rezultira s pojavom epidemij ali pandemij. Tehnične izboljšave kot so genetske in funkcijske raziskave bodo pomagale pri doseganju globljega spoznavanja patogeneze zgodovinskih in sevov gripe, ki sedaj krožijo. To znanje in napredki v razumevanju protivirusnih imunskih obrambnih mehanizmov v pljučih človeka bodo v pomoč za lažji razvoj možnosti boljšega zdravljenja in razvoja učinkovitega cepiva proti sedanjim in bodočim variantam virusa, ki ga bo treba distribuirati po svetu.

Literatura

7. Abramson JS, Wheeler JG, Parce JW, et al. Suppression of endocytosis in neutrophils by influenza A virus in vitro. J Infect Dis 1986; 154: 456-63. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3734493
8. Achdout H, Arnon TI, Markel G, et al. Enhanced recognition of human NK receptors after influenza virus infection. J Immunol 2003; 171: 915-23. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12847262
9. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. Science 1996; 272: 54-60. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8600537
10. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 2004; 4: 499-511. http://amedeo.com/lit.php?id=15229469
11. Alford RH, Kasel JA, Gerone PJ, Knight V. Human influenza resulting from aerosol inhalation. Proc Soc Exp Biol Med 1966; 122: 800-4. http://amedeo.com/lit.php?id=5918954
12. Apisarnthanarak A, Kitphati R, Thongphubeth K, et al. Atypical avian influenza (H5N1). Emerg Infect Dis 2004; 10: 1321-4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15324560
13. Baigent SJ, McCauley JW. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission. Bioessays 2003; 25: 657-71. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12815721
14. Beigel JH, Farrar J, Han AM, et al. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. N Engl J Med 2005; 353: 1374-85. http://amedeo.com/lit.php?id=16192482

15. Belz GT, Smith CM, Kleinert L, et al. Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 8670-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15163797
16. Bridges CB, Kuehnert MJ, Hall CB. Transmission of influenza: implications for control in health care settings. Clin Infect Dis 2003; 37: 1094-101. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14523774
17. Brydon EW, Morris SJ, Sweet C. Role of apoptosis and cytokines in influenza virus morbidity. FEMS Microbiol Rev 2005; 29: 837-50. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16102605
18. Buxton Bridges C, Katz JM, Seto WH. Risk of influenza A (H5N1) infection among health care workers exposed to patients with influenza A (H5N1), Hong Kong. J Infect Dis 2000; 181: 344-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10608786
19. Cassidy LF, Lyles DS, Abramson JS. Synthesis of viral proteins in polymorphonuclear leukocytes infected with influenza A virus. J Clin Microbiol 1988; 26: 1267-70. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3045149
20. Chan MC, Cheung CY, Chui WH, et al. Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. Respir Res 2005; 6: 135. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16283933
21. Chen W, Calvo PA, Malide D, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. Nat Med 2001; 7: 1306-12. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11726970
22. Cheung CY, Poon LL, Lau AS, et al. 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
23. Chotpitayasunondh T, Ungchusak K, Hanshaoworakul W, et al. Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004. Emerg Infect Dis 2005; 11: 201-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15752436
24. Cox NJ, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses: Influenza. In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th ed., Collier L, Balows A., Sussman M., eds., Edward Arnold, London Vol.1, 1997: 385-433.
25. Daniels RS, Douglas AR, Skehel JJ, et al. Antigenic analyses of influenza virus haemagglutinins with different receptor-binding specificities. Virology 1984; 138: 174-7. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=6208680
26. de Bree GJ, van Leeuwen EM, Out TA, Jansen HM, Jonkers RE, van Lier RA. Selective accumulation of differentiated CD8+ T cells specific for respiratory viruses in the human lung. J Exp Med 2005; 202: 1433-42. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16301748
27. Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM. Principles of virology. Molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses. 2nd Edition, ASM Press, Washington, DC, USA, 2004
28. Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ, et al. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. Science 2004; 303: 1838-42. Epub 2004 Feb 5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=14764886
29. Garcia-Sastre A, Egorov A, Matassov D, et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. Virology 1998; 252: 324-30. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9878611
30. Garcia-Sastre A. Antiviral response in pandemic influenza viruses. Emerg Infect Dis 2006 (in press).
31. Goto H, Kawaoka Y. A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 10224-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9707628
32. Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, et al. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. J Biol Chem 2005; 280: 5571-80. Epub 2004 Dec 3. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15579900

33. Hall WJ, Douglas RG Jr, Hyde RW, Roth FK, Cross AS, Speers DM. Pulmonary mechanics after uncomplicated influenza A infection. Am Rev Respir Dis 1976; 113: 141-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1247227
34. Hayden FG, Fritz R, Lobo MC, Alvord W, Strober W, Straus SE. Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virus infection. Relation to symptom formation and host defense. J Clin Invest 1998; 101: 643-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=9449698
35. Heath WR, Belz GT, Behrens GM, et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. Immunol Rev 2004; 199: 9-26. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15233723
36. Hemmes JH, Winkler KC, Kool SM. Virus survival as a seasonal factor in influenza and polimyelitis. Nature 1960; 188: 430-1. http://amedeo.com/lit.php?id=13713229
37. Horner GJ, Gray FD Jr. Effect of uncomplicated, presumptive influenza on the diffusing capacity of the lung. Am Rev Respir Dis 1973; 108: 866-9. http://amedeo.com/lit.php?id=4741881
38. Hulse DJ, Webster RG, Russell RJ, Perez DR. Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. J Virol 2004; 78: 9954-64. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15331729
39. Ishikawa E, Nakazawa M, Yoshinari M, Minami M. Role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune response to influenza virus infection in mice. J Virol 2005; 79: 7658-63. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15919918
40. Johansson BE, Bucher DJ, Kilbourne ED. Purified influenza virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection. J Virol 1989; 63: 1239-46. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=2915381
41. 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. http://amedeo.com/lit.php?id=10558929
42. Katze MG, DeCorato D, Krug RM. Cellular mRNA translation is blocked at both initiation and elongation after infection by influenza virus or adenovirus. J Virol 1986; 60: 1027-39. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3023655
43. Kondo S, Abe K. The effects of influenza virus infection on FEV1 in asthmatic children. The time-course study. Chest 1991; 100: 1235-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1935277
44. Lawrence CW, Braciale TJ. Activation, differentiation, and migration of naive virus-specific CD8+ T cells during pulmonary influenza virus infection. J Immunol 2004; 173: 1209-18. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15240712
45. Lawrence CW, Ream RM, Braciale TJ. Frequency, specificity, and sites of expansion of CD8+ T cells during primary pulmonary influenza virus infection. J Immunol 2005; 174: 5332-40. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15843530
46. Legge KL, Braciale TJ. Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. Immunity 2003; 18: 265-77. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12594953
47. Levandowski RA, Gerrity TR, Garrard CS. Modifications of lung clearance mechanisms by acute influenza A infection. J Lab Clin Med 1985; 106: 428-32. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=4045299
48. Lipatov AS, Andreansky S, Webby RJ, et al. 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
49. Little JW, Douglas RG Jr, Hall WJ, Roth FK. Attenuated influenza produced by experimental intranasal inoculation. J Med Virol 1979; 3: 177-88. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=479857

50. Little JW, Hall WJ, Douglas RG Jr, Mudholkar GS, Speers DM, Patel K. Airway hyperreactivity and peripheral airway dysfunction in influenza A infection. Am Rev Respir Dis 1978; 118: 295-303. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=358877
51. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. Nature 2001; 409: 1055-60. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11234016
52. Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. J Virol 2000; 74: 8502-12. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10954551
53. 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 2004; 101: 4620-4. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15070767
54. McCullers JA, Rehg JE. Lethal synergism between influenza virus and Streptococcus pneumoniae: characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor. J Inf Dis 2002; 186: 341-50. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12134230
55. Mori I, Komatsu T, Takeuchi K, Nakakuki K, Sudo M, Kimura Y. In vivo induction of apoptosis by influenza virus. J Gen Virol 1995; 76: 2869-73. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7595397
56. Olofsson S, Kumlin U, Dimock K, Arnberg N. Avian influenza and sialic acid receptors: more than meets the eye? Lancet Infect Dis 2005; 5: 184-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15766653
57. Palladino G, Mozdzanowska K, Washko G, Gerhard W. Virus-neutralizing antibodies of immunoglobulin G (IgG) but not of IgM or IgA isotypes can cure influenza virus pneumonia in SCID mice. J Virol 1995; 69: 2075-81. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=7884853
58. Park CH, Ishinaka M, Takada A, The invasion routes of neurovirulent A/Hong Kong/483/97 (H5N1) influenza virus into the central nervous system after respiratory infection in mice. Arch Virol 2002; 147: 1425-36. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12111416
59. Peiris JS, Yu WC, Leung CW, et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. Lancet 2004; 363: 617-9. http://amedeo.com/lit.php?id=14987888
60. Piqueras B, Connolly J, Freitas H, Palucka AK, Banchereau J. Upon viral exposure myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce three waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. Blood 2005; Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16317096
61. Renegar KB, Small PA Jr, Boykins LG, Wright PF. Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract. J Immunol 2004; 173: 1978-86. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15265932
62. Sanz-Ezquerro JJ, Zurcher T, de la Luna S, Ortin J, Nieto A. The amino-terminal one-third of the influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis. J Virol 1996; 70: 1905-11. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8627716
63. Schmitz N, Kurrer M, Bachmann MF, Kopf M. Interleukin-1 is responsible for acute lung immunopathology but increases survival of respiratory influenza virus infection. J Virol 2005; 79: 6441-8. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15858027
64. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol 2002; 2: 151-61. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11913066
65. Silver ML, Guo HC, Strominger JL, Wiley DC. Atomic structure of a human MHC molecule presenting an influenza virus peptide. Nature 1992; 360: 367-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=1448154

66. Taubenberger JK. Influenza virus hemagglutinin cleavage into HA1, HA2: no laughing matter. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 9713-5. http://amedeo.com/lit.php?id=9707539
67. To KF, Chan PK, Chan KF, et al. Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. J Med Virol 2001; 63: 242-6. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11170064
68. Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, et al. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. N Engl J Med 2004; 350: 1179-88. http://amedeo.com/lit.php?id=14985470
69. Treanor JJ. Influenza virus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett□s Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Churchill Livingstone; 2004: 2060-2085.
70. Tsitoura DC, Kim S, Dabbagh K, Berry G, Lewis DB, Umetsu DT. Respiratory infection with influenza A virus interferes with the induction of tolerance to aeroallergens. J Immunol 2000; 165: 3484-91. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=10975869
71. Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. Science 2005; 310: 77-80. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16210530
72. Uiprasertkul M, Puthavathana P, Sangsiriwut K, et al. Influenza A H5N1 replication sites in humans. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1036-41. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16022777
73. Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell SF, et al. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). N Engl J Med 2005; 352: 333-40. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15668219
74. Utell MJ, Aquilina AT, Hall WJ, et al. Development of airway reactivity to nitrates in subjects with influenza. Am Rev Respir Dis 1980; 121: 233-41. http://amedeo.com/lit.php?id=7362132
75. Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. Nature 1988; 333: 426-31. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=3374584
76. Wiley JA, Cerwenka A, Harkema JR, Dutton RW, Harmsen AG. Production of interferon-gamma by influenza hemagglutinin-specific CD8 effector T cells influences the development of pulmonary immunopathology. Am J Pathol 2001a; 158: 119-30. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11141485
77. Wiley JA, Hogan RJ, Woodland DL, Harmsen AG. Antigen-specific CD8(+) T cells persist in the upper respiratory tract following influenza virus infection. J Immunol 2001b; 167: 3293-9. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=11544317
78. Wiley JA, Tighe MP, Harmsen AG. Upper respiratory tract resistance to influenza infection is not prevented by the absence of either nasal-associated lymphoid tissue or cervical lymph nodes. J Immunol 2005; 175: 3186-96. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16116209
79. Wilson NS, Behrens GMN, Lundie RJ, Systemic activation of dendritic cells by TLR ligands or malaria infection impairs cross cross-priming and anti-viral immunity. Nat Immunol 2006 (in press)
80. Woodland DL. Cell-mediated immunity to respiratory virus infections. Curr Opin Immunol 2003; 15: 430-5. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=12900275
81. Woodland DL, Randall TD. Anatomical features of anti-viral immunity in the respiratory tract. Semin Immunol 2004; 16: 163-70. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15130500
82. Woodland DL, Scott I. T cell memory in the lung airways. Proc Am Thorac Soc 2005; 2: 126-31. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16113480
83. Yeldandi AV, Colby TV. Pathologic features of lung biopsy specimens from influenza pneumonia cases. Hum Pathol 1994; 25: 47-53. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=8314260
84. Yen HL, Herlocher LM, Hoffmann E, et al. Neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses may differ substantially in fitness and transmissibility. Antimicrob

Agents Chemother 2005; 49: 4075-84. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=16189083
85. 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. http://amedeo.com/lit.php?id=9482437
86. Yuen KY, Wong SS. Human infection by avian influenza A H5N1. Hong Kong Med J 2005; 11: 189-99. Abstract: http://amedeo.com/lit.php?id=15951584