

新发高致病性禽流感 H5N1 病毒的致病性、传播力研究及进化分析

袁 静,许黎黎,鲍琳琳,吕 琦,李枫棣,于 品,秦 川

(中国医学科学院医学实验动物研究所,卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 对 2011 年底导致香港红嘴鸥死亡、并与深圳死亡患者分离株高度同源的新发高致病性禽流感 H5N1 病毒的致病性及传播力进行预警,同时对其序列进行遗传进化分析。**方法** 对新发 H5N1 病毒进行感染性评价,证实其是否确实具有在人类细胞中增殖的能力,并对新发毒株在细胞及小鼠中的感染性进行评价,并对其进行小鼠群体中的传播力进行研究。同时,还基于 HA 蛋白序列对新发病毒进行遗传分析,确定其进化地位。**结果** 新发 H5N1 病毒在体外对人源肺细胞具有一定程度的感染性,对小鼠的致病性相比目前毒力最强 H5N1 毒株及 WHO 推荐的禽流感疫苗制备株较弱,可在小鼠群体间进行有效传播,但诱发机体体液免疫保护程度较弱。**结论** 新病毒进化地位属于 Clade 2.3.2.1,为近年来的国内主流流行株,其进化的过程中暂未发生导致致病性增强的正向选择事件。

【关键词】 H5N1 病毒;致病性;传播力;进化分析

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 01-0045-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.001.011

Research on the pathogenicity, transmission, and phylogenetic analysis of the new emerging infectious avian influenza H5N1 virus

YUAN Jing, XU Li-li, BAO Lin-lin, LV Qi, LI Feng-di, YU Pin, QIN Chuan

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Laboratory Animal Science; Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the pathogenicity, transmission ability, and phylogenesis of the dead black headed gull isolated new emerging infectious H5N1 virus which was existed in the end of 2011. **Methods** To verify whether the dead black headed gull isolated H5N1 could infect human source cells, and investigate the replication ability, virulence and pathogenicity in MDCK cells and BALB/c mouse model. Meanwhile, the transmission ability of the new emerging infectious H5N1 will be tested using mouse model. Meanwhile, phylogenetic analysis was done based on HA protein sequence. **Results** The new emerging H5N1 virus could replicate in some human lung cell lines, and the pathogenicity to BALB/c mice is weaker than the most virulent H5N1 strain and the vaccine preparation strain. However, the new virus could be efficiently transmitted among mice, but the protective antibody could not be detected in mice. **Conclusion** Phylogenetic analysis based on HA amino acid sequences showed it belong to clade 2.3.2.1, which is the

【基金项目】 十二五科技重大专项 (2012ZX10004501-004-003, 2012ZX10004501-004-004, 2012ZX10004301-8); 国家自然科学基金 (31370203); 科技部 H7N9 禽流感应急防控专项 (KJYJ-2013-01-04); 协和青年教师培养项目 (2012Y2, 2012D15)。

【作者简介】 袁静 (1986 -), 博士生, 研究方向: 免疫学。

【通讯作者】 秦川, 教授, 博士生导师。E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn。

main epidemic group in recent years.

【Key words】 H5N1 virus; Pathogenicity; Transmission ability; Phylogenetic analysis

流感是由流感病毒引起的一种急性呼吸道传染病,它通过飞沫传播,能在短时间内迅速蔓延。1997 年香港首次报道了 18 例人感染高致病性 H5N1 禽流感病例,其中 6 例死亡,感染的临床特征包括骤然发热和上呼吸道感染等典型流感症状,许多病人出现严重并发症,主要有肺炎、胃肠道症状、肝酶升高和肾衰^[1]。其后,全球已经有 15 个国家和地区相继出现了人禽流感病例和有限的人际间传播报道^[2]。时至 2011 年底,世界卫生组织(WHO)共累计接收人感染 H5N1 病例报告 584 例,死亡 345 例,病死率接近 60%^[3],远高于 2003 年全球严重急性呼吸综合症(SARS)疫情时 11% 的总体死亡率。鉴于甲型流感病毒高度变异和 2009 年出现的新型甲型 H1N1 流感全球大流行,高致病性禽流感 H5N1 病毒仍然是引起全球流感大流行疫情的潜在病原之一,散在出现的人际间传播事件表明 H5N1 病毒一旦突破物种间屏障而在人群中流行,必将成为世界各国所面临的巨大公共卫生威胁之一,将会给人类的生存和发展带来灾难性打击。

2011 年底,香港再度爆发禽流感,死亡的红嘴鸥证实感染禽流感 H5N1 病毒,并且其基因序列与同期深圳死亡患者高度同源,此次疫情再次提醒我们,在环境选择压力下,禽流感 H5N1 病毒不断的抗原漂移现象可能随时导致其跨越物种屏障,从而实现对人群的感染。因此,加强对新发 H5N1 病毒感染性及传播力的研究,对于防范可能发生的禽流感疫情,具有非常重要的现实意义。

本文拟对 2011 年底香港死亡红嘴鸥所携带的、与深圳死亡患者分离株高度同源的 H5N1 病毒进行感染性评价,证实其是否确实具有在人类细胞中增殖的能力,并对该毒株体外基于细胞水平的复制能力以及体内基于小鼠模型的毒力与致病性进行研究,与迄今为止毒力最强的 H5N1 毒株 A/Shenzhen/406H/2006 及 WHO 推荐的禽流感 H5N1 疫苗制备

株 A/Vietnam/1194/2004 进行比较。同时,设立攻毒组与同居组,对新发 H5N1 病毒能否在小鼠群体间传播进行评测,从而对新病毒的传播力进行研究。此外,通过对病毒的 HA 基因进行测序及序列分析,构建病毒的进化树,分析其分子遗传进化地位。研究结果对于应对未来可能出现的禽流感疫情具有非常重要的现实意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒:本研究所使用毒株详情参见表 1,均由香港大学陈洪霖教授惠赠。体外细胞感染实验及体内动物攻毒实验都按照 WHO 指导原则在 ABSL-3 实验室中进行。

1.1.2 细胞:犬肾细胞 MDCK、人肺腺癌细胞 A549、及小细胞肺癌细胞 NCI-H446 均于本课题组保存。

1.1.3 实验动物:5 周龄 SPF 级雌性 BALB/C 小鼠由医科院医学实验动物研究所提供(合格证号:SCXK(京)2006-0009)(实验室许可证号:ILAS-PC-2012-002)。

1.2 方法

1.2.1 体外(*In vitro*)细胞感染实验:细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM (Invitrogen) 中培养,将 10² TCID₅₀ 的病毒液接种于培养在直径 35 mm 培养板内的单层细胞中,37℃ 吸附 60 min,加入 10 mL 无血清培养基、含 TPCK 的胰蛋白酶(0.5 μg/mL)和双抗。分别在感染细胞后 12,24,36,48,56,72 h 收集 250 μL 病毒上清液,3000 r/min 离心 10 min,取上清通过 Real-time PCR 测定病毒核酸载量。

1.2.2 体内(*In vivo*)小鼠感染实验:每组 12 只小鼠分为组 1(8 只)及组 2(4 只)。将小鼠按 0.02 mL/g 比例肌注三溴乙醇麻醉后,通过滴鼻途径对小鼠进行攻毒,每只小鼠接种 10² TCID₅₀ 病毒液 50

表 1 本研究中所使用的高致病性禽流感 H5N1 病毒详情
Tab.1 Details of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus

毒株 (Virus)	采集时间 (Time)	宿主 (Host)	备注 (Note)
A/black headed gull/Hong Kong/07035-1/2011 (简称 07035)	2011. 12	鸟 Bird	2011 年底新发红嘴鸥分离株,基因序列与同期深圳死亡病人高度同源
A/Shenzhen/406H/2006 (简称 SZ)	2006. 6	人 Human	迄今为止毒力最强的 H5N1 毒株
A/Vietnam/1194/2004 (简称 VN)	2004. 6	人 Human	WHO 推荐的禽流感 H5N1 疫苗制备株

μL 。组 1 小鼠连续观察 14 d, 记录临床表征和死亡率。组 2 小鼠在攻毒后第 5 天, 安乐后取肺组织, 通过 Real-time PCR 测定病毒核酸载量。

1.2.3 小鼠同居实验: 18 只小鼠随机分配于两个鼠盒中, 每盒 9 只, 其中 3 只标记后通过滴鼻途径进行攻毒, 另外 6 只同笼饲养。第一盒同居小鼠于攻毒后 5, 8, 11 d 各安乐 2 只, 取肺组织, 测定病毒核酸载量及滴度。第二盒同居小鼠于攻毒后 14, 21, 28 d 各摘除 2 只小鼠的眼球获取血清, 通过血凝抑制实验及微量中和实验测定抗体效价。

1.2.4 Real-time PCR: 小鼠肺组织研磨成匀浆, 从上清液中提取 RNA (Qiagen), 溶于 30 μL Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 处理过 H_2O 中, 保存于 -80°C 。取 8 μL RNA 进行逆转录 cDNA 的合成, 加入到总体积为 20 μL , 含有 200 U Superscript III 逆转录酶 (Invitrogen) 的反应体系中。实时荧光定量 PCR 检测体系为 20 μL , 包括 10 μL 2 $\times$ SYBR Green 荧光染料 Mix (ABI), 各 1 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 的正向和反向引物 (NP-688F: 5'-ttccaaacagcagcacaag-3', NP-817R: 5'-tatgggccaatgatcctctc-3'), 2 μL cDNA 模板和 6 μL 无 RNA 酶的 H_2O 。热循环条件, 94°C 3 min, 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 35 个循环。每个循环结束后读取荧光值。

1.2.5 血凝抑制实验 (HI): 先用 Receptor-destroying enzyme (RDE) 酶处理血清, 1 份血清加入 3 份 RDE 酶工作液, 37°C 水浴 12 ~ 16 h 后 56°C 灭活 30 min。将 1 份浓缩火鸡血和 10 份 RDE 酶工作液处理过的灭活血清 (200 μL) 充分混匀, 4°C 放置 1 h, 重悬后 1200 r/min 离心 5 min, 取上清, 向其中加入 2.5 倍血清体积的 PBS 溶液即得到工作血清。96 孔 V 型板除第一列 (共八列) 外, 每孔加入 25 μL 的 PBS, 在第一, 二, 八列每孔加入 25 μL 工作血清, 从第二列移取 25 μL , 由第二到第七列对倍稀释, 每孔加入 25 μL 新调制的 4HA 病毒液 (最后一列除外), 充分混匀, 室温静置 40 min, 每孔加入 1% 火鸡血 50 μL , 室温静置 30 min 观察结果。将 96 孔 V 型板垂直竖起, 观察孔底红细胞滑下速度, 待对照孔内红细胞自由下滑呈泪滴状时读结果, 红细胞下滑速度与对照相同者为完全抑制, 完全抑制时的血清最高稀释度即抗体效价。

1.2.6 微量中和实验 (MN): 将攻毒后 14、21、28 d 的小鼠血清放在 60°C 水浴锅中灭活 30 min, 之后在 96 孔板中将待检血清用维持液稀释为 1:8、1:16、1:

32……1:1 024。将稀释好的血清 100 μL /每孔分别与 100 μL 10^2 TCID₅₀ 的病毒等量混合, 37°C 孵育 1 h。将血清-病毒混合液接种于培养在 96 孔培养板内的单层 MDCK 细胞中, 经 3 天培养观察细胞病变 (CPE), 同时吸取上清每孔 50 μL , 加入 1% 的火鸡血 50 μL , 混匀, 静止 30 min 进行复核实验。

1.2.7 基因测序、比对、及进化树构建: 病毒 HA 基因分为相互重叠的三段利用高保真 PCR 系统进行扩增 (KOD plus, TOYOBO), 所用引物序列为: HAF1 (1 ~ 22): 5'-atggagaaaatagtgcttctt-3'; HAR1 (651-671): 5'-ctctggttaagtgttgatgctc-3'; HAF2 (481 ~ 502): 5'-agaaatgtgatatggcttatca-3'; HAR2 (1201 ~ 1221): 5'-ctgagtgttcattttgcaat-3'; HAF3 (925 ~ 945): 5'-aacatacaccctctcaccatc-3'; HAR3 (1693 ~ 1715): 5'-ctcacaaatttaaatgcaaatc-3'。扩增产物纯化后 (QIAGEN) 外送测序 (中美泰和)。利用 CLUSTAL W (version 1.83) 软件对 HA 基因序列进行比对, 利用 MEGA5.0 软件基于 HA 蛋白序列构建 Neighbor-joining 进化树, 校验值 (bootstrap) 设为 500。

1.2.8 数据统计分析: 病毒核酸载量和滴度的数据处理运用 SPSS 11.5 软件包中 DUNCAN 及 LSD 法进行 ANOVA 单因素方差分析。

2 结果

2.1 新发 H5N1 毒株 07035 对人源肺细胞的感染性研究

将 10^2 TCID₅₀ 的 07035 毒株分别感染人肺腺癌细胞 A549 及小细胞肺癌细胞 NCI-H446, 在感染细胞后 12, 24, 36, 48, 56, 72 h 收集病毒上清液, 取上清测定病毒核酸载量。结果显示, 07035 病毒可在 A549 细胞中有效复制, 拷贝数从 12 ~ 72 h 呈持续增长态势 ($P < 0.05$), 而其在 NCI-H446 中并不能增殖 (图 1), 说明 07035 病毒在体外对人源肺细胞具有一定程度的感染性。

2.2 细胞水平 (*In vitro*) 病毒复制能力比较

将 10^2 TCID₅₀ 的新发 H5N1 病毒 07035、迄今为止毒力最强的 SZ 株、及 WHO 推荐的禽流感疫苗制备株 VN 分别感染 MDCK 细胞。病毒复制动力学结果显示, 07035 毒株在 MDCK 细胞中于 56 h. p. i 达到复制峰值, 同时, 从感染后 12 ~ 72 h, 07035 在 MDCK 细胞中的复制能力较 SZ 与 VN 株稍低, 但与后两者并不存在显著性差异 ($P > 0.05$) (图 2)。

2.3 小鼠体内 (*In vivo*) 病毒毒力及致病性比较

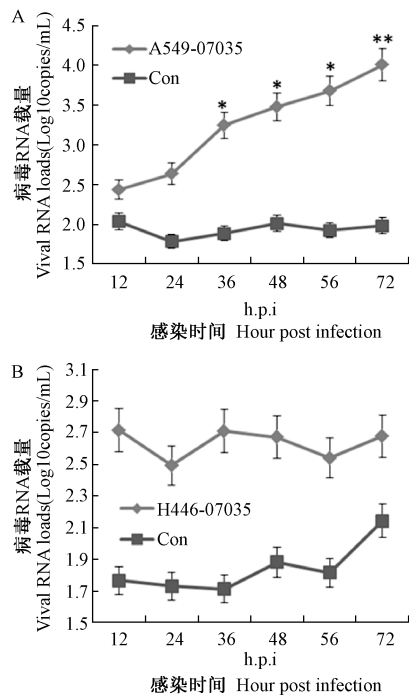


图1 07035 毒株体外在人源肺细胞中的复制曲线。
(A) A549 细胞; (B) NCI-H446 细胞

Fig.1 Replication kinetics of 07035 virus in human lung cells. (A) A549 cells; (B) NCI-H446 cells

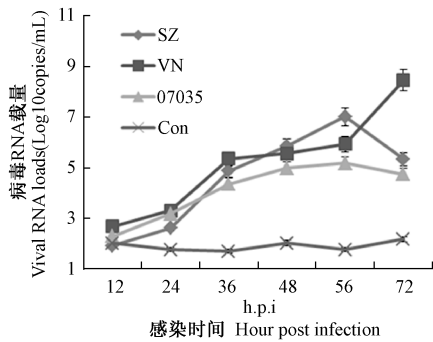


图2 07035 毒株与 SZ 及 VN 株在 MDCK 细胞中复制能力比较
Fig.2 Replication kinetics of 07035, SZ, and VN viruses in MDCK cells

将 10^2 TCID₅₀ 的 07035、SZ、及 VN 分别对 BALB/c 小鼠攻毒,通过观察小鼠的存活率,体重变化情况,肺组织中病毒核酸载量等,来对病毒的毒力及致病性进行比较。小鼠攻毒后连续观察 14 d,其中感染 SZ 及 VN 株的小鼠 100% 死亡,而 07035 感染后小鼠仍有 12.5% 存活(图 3)。SZ 与 VN 感染的小鼠平均存活天数显著低于 07035 感染的小鼠(图 4)。由图 5 可见 SZ 株感染的小鼠体重下降最为显著,其次为 VN 株,下降最少的为 07035 感染的小鼠。同时,Real-time PCR 结果可见 SZ 与 VN 感染

的小鼠肺组织病毒核酸拷贝数显著高于 07035 感染的小鼠($P < 0.01$)(图 6)。因此,新发禽流感 H5N1 病毒 07035 对小鼠的致病性较目前毒力最强的 SZ 株及 WHO 推荐的疫苗制备株 VN 较弱,在进化的过程中暂未发生导致致病性增强的正向选择事件。

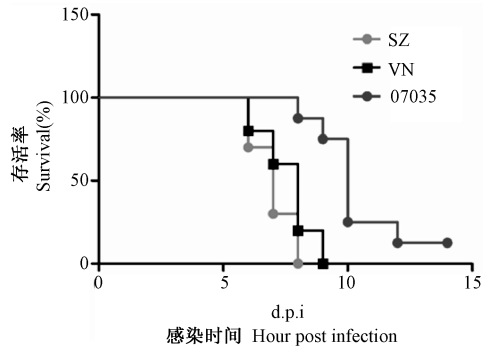


图3 10^2 TCID₅₀ 的 07035、SZ、VN 株感染小鼠后的存活曲线
Fig.3 Survival percentage of mice intranasally challenged with 07035, SZ or VN virus with 10^2 TCID₅₀ in a volume of 50 μ L

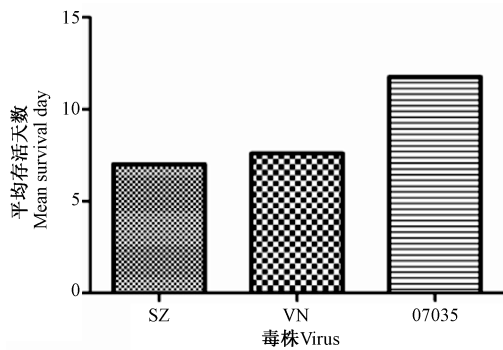


图4 10^2 TCID₅₀ 的 07035、SZ、VN 株感染小鼠后的平均存活天数
Fig.4 Mean survival days of mice intranasally challenged with 07035, SZ or VN virus with 10^2 TCID₅₀ in a volume of 50 μ L

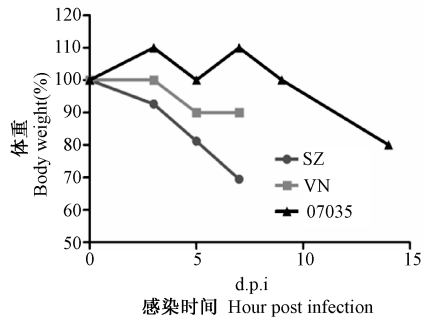


图5 10^2 TCID₅₀ 的 07035、SZ、VN 株感染小鼠后的体重变化曲线
Fig.5 Body weight change of mice intranasally challenged with 07035, SZ or VN virus with 10^2 TCID₅₀ in a volume of 50 μ L

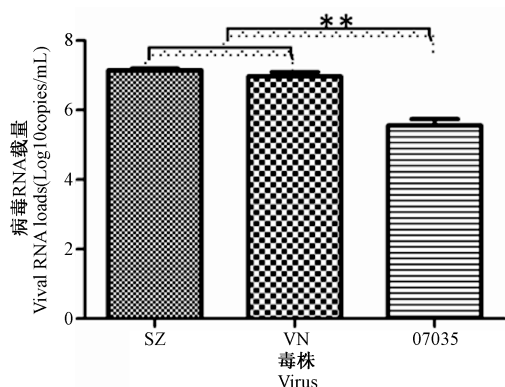


图 6 10^2 TCID₅₀ 的 07035、SZ、VN 株感染小鼠后第 5 天肺组织携带病毒核酸拷贝数

Fig. 6 Viral RNA loads in lungs of mice at 5 d. p. i. which intranasally challenged with 07035, SZ or VN virus with 10^2 TCID₅₀ in a volume of 50 μ L

2.4 新发 H5N1 毒株 07035 在小鼠群体间的传播力研究

每盒 9 只小鼠中 3 只被攻毒的小鼠于感染后 9 d 内全部死亡,同居小鼠第 5 天及第 8 天肺组织检测不到病毒核酸载量,而第 11 天两只同居小鼠中的一只经 Real-time PCR 检测为阳性,拷贝数为 6×10^8 copies/mL。将 PCR 产物外送测序证实其与攻毒毒株 07035 100% 同源。此外,将该同居小鼠的肺组织上清接种 MDCK 细胞,传至第二代时出现典型 CPE 现象,测定其滴度为 $10^{4.86}$ TCID₅₀。然而,同居小鼠第 14, 21, 28 天的血清经血凝抑制实验及微量中和实验检测,其结果均为阴性。以上结果证实 07035 毒株可在小鼠群体间进行有效传播,但诱发机体体液免疫保护程度较弱。

2.5 新发 H5N1 病毒的遗传进化分析

对 07035 的 HA 基因进行分段高保真 PCR 后外送测序,序列拼接后已提交至 Genbank 数据库中,登陆号为 JQ922566。与 WHO 禽流感 H5N1 监测网络提供的各进化分支 (Clade) 代表株进行序列多重比对后,构建了 HA 蛋白的分子遗传进化树 (图 7)。结果证实 07035 的进化地位属于 2.3.2.1,为近年来的主流流行 Clade。值得注意的是,与 07035 最为同源的毒株 A/Guangxi/1/2009 分离自我国广西一名因接触病死禽类而感染 H5N1 并导致死亡的 18 岁男孩体内。

3 讨论

流感病毒特异性受体末端的 N-乙酰基神经氨

酸 (又称为唾液酸) 可与半乳糖以 $\alpha 2,3$ 或 $\alpha 2,6$ 键的方式结合,所形成的受体分别命名为 $\alpha 2,3$ 唾液酸受体或 $\alpha 2,6$ 唾液酸受体。通常情况下,人源流感病毒识别 $\alpha 2,6$ 唾液酸受体,而禽源病毒识别 $\alpha 2,3$ 唾液酸受体^[4]。Shinya 等^[5]报道人呼吸道组织切片从鼻腔至终末和呼吸细支气管主要表达 $\alpha 2,6$ 唾液酸受体,除鼻腔粘膜个别上皮细胞偶尔表达 $\alpha 2,3$ 唾液酸受体外,其他部位缺乏 $\alpha 2,3$ 唾液酸受体,相反,下呼吸道的呼吸细支气管与肺泡之间连接部的非纤毛立方细胞以及肺泡细胞表达 $\alpha 2,3$ 唾液酸受体为主。因此理论状态下禽流感 H5N1 病毒并不具备在人际间通过空气经上呼吸道传播的能力。然而,目前仍有少量 H5N1 在人际间传播的散发案例的报道^[6-9]。本研究中将攻毒鼠与健康鼠同笼饲养,健康鼠获得了感染,说明新发 H5N1 病毒可在小鼠群体间通过接触而传播。有学者曾用 1997 年的人 (A/HK156/97) 及鸡 (A/Chicken/Hong Kong/258/97) H5N1 分离毒株感染猪及小鼠,并将健康的猪及小鼠分别与攻毒动物同笼饲养,结果同笼饲养的猪、小鼠均未发生感染^[10]。也有人用 2.5×10^4 TCID₅₀ 的 VN 株感染家猫,并将健康家猫与感染猫同舍饲养,结果健康猫获得感染,这可能与所使用的毒株以及攻毒剂量等有关,另一方面也提示经过进化后病毒的致病力及传播力可能发生了变化^[11]。H5N1 病毒在禽类群体间拥有较明确的泄殖腔-口腔传播途径,而其在人类及哺乳动物之间能否进行传播,至今仍存在争议。2004 年泰国动物园中大量虎发生 H5N1 感染,通过流行病学调查及病原学等研究认为病毒在老虎之间可能发生了水平传播^[12]。自 1997 年以来,H5N1 呈现出致病力逐渐增强的态势,体现在人感染后病死率的增加、病毒抗原特性的变化、内部基因的重排以及宿主范围的扩大等,提示 H5N1 在人与人之间传播的可能性大大增加,而近年来越南、泰国、印度尼西亚已出现 H5N1 病毒感染的家庭聚集现象^[10, 13-17]。但也有人对此持反对意见,他们认为家庭成员所生活的环境、背景、生活习惯都基本相同,不能完全确定感染源,看护 H5N1 感染病人的护理员的血清抗体也均呈阴性^[18-21]。有学者担心 H5N1 病毒是否与人流感病毒发生了基因重组,从而使传播能力大大增强,设计了将 H5N1 病毒与引起 1968 年流感大流行的 H3N2 病毒杂交,杂交后的病毒能感染雪貂,但不能引起雪貂间的水平传播,说明杂交后的病毒传播力

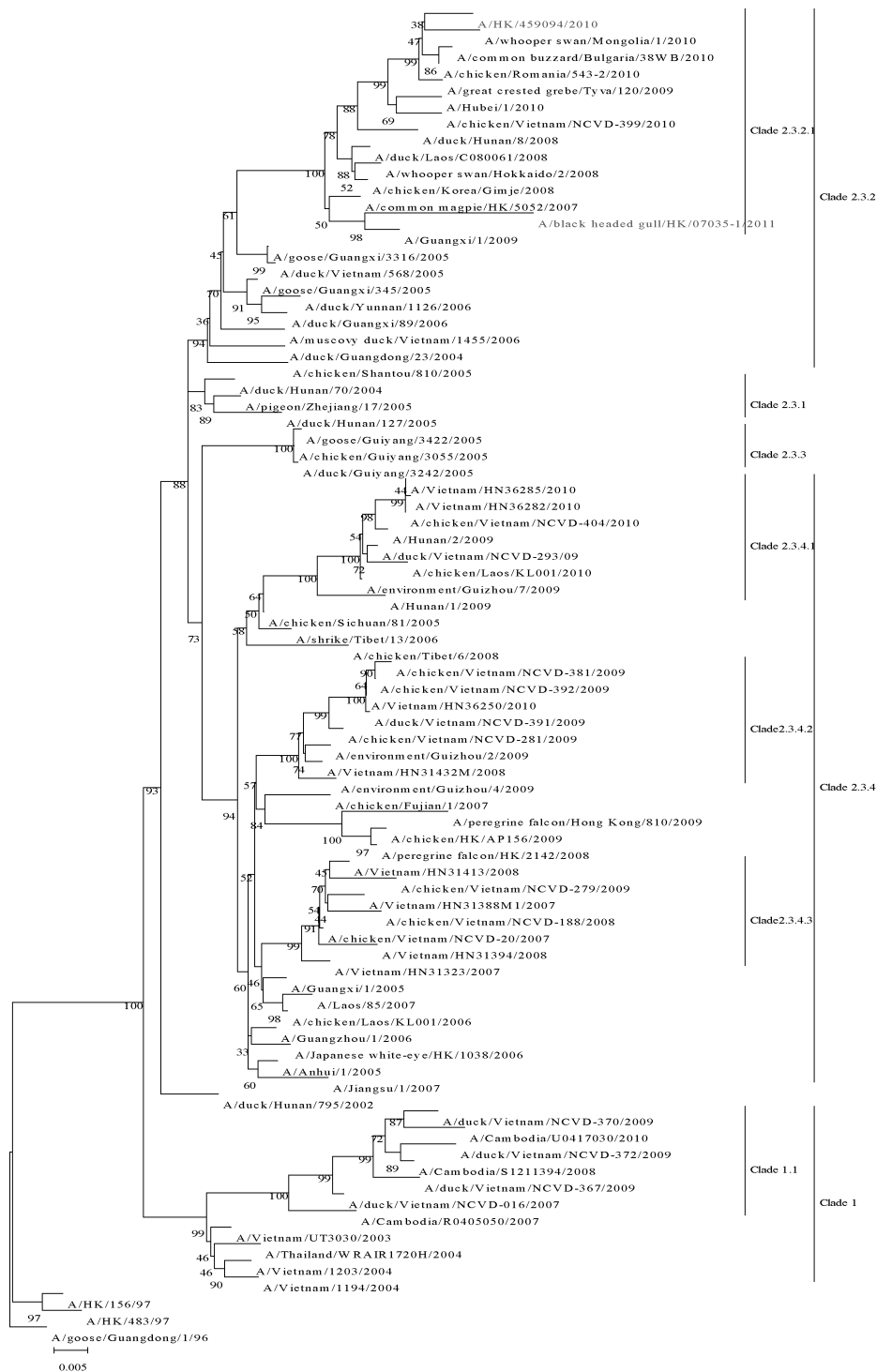


图 7 基于 HA 蛋白序列的分子遗传进化树

Fig.7 Phylogenetic tree built with HA amino acid sequences

并没有增强,同时也提示人流感病毒与禽流感病毒的重组并不像我们想象中的那么容易,可能是一个非常复杂的过程^[20]。但是,2011 年底,来自荷兰的病毒学家 Ron Fouchier 和来自美国的病毒学教授 Yoshihiro Kawaoka 分别在某国际流感会议上扔下两枚重磅炸弹——他们对禽流感 H5N1 病毒进行基因

改造,培育出的 H5N1 病毒变种已具备在雪貂间通过空气传播的能力,并暗示也具备在人际间传播的可能。说明 H5N1 病毒仍然是引起全球流感大流行疫情的潜在病原之一,加强对新发病毒感染性及传播力监测具有重要的现实意义。

本实验中健康鼠通过与攻毒鼠同笼饲养而获

得了感染,再次证实 H5N1 已具备在哺乳动物之间进行传播的能力。传播的可能途径包括:空气飞沫、粪口污染、身体接触等多个方面,具体是通过何种方式进行传播还有待进一步的研究。尽管本研究结果显示新发 H5N1 病毒 07035 对小鼠的致病性相比目前毒力最强的 SZ 株及 WHO 推荐的疫苗制备株 VN 较弱,在进化的过程中暂未发生导致致病性增强的正向选择事件。但 07035 毒株可在小鼠群体间进行有效传播且诱发机体体液免疫保护程度较弱的结果值得高度关注。尤其是与 07035 最为同源的毒株 A/Guangxi/1/2009 分离自我国广西一名因接触病死禽类而感染 H5N1 并导致死亡的 18 岁男孩体内,而且 07035 病毒在体外对人源肺细胞还具有一定程度的感染性,都说明新发禽流感 H5N1 病毒 07035 存在潜在传给人的威胁。若病人同时受人类流感病毒及禽流感病毒感染,就有可能成为病毒的“混合炉”,并存在产生在人群间传播能力的高致病性新型重组病毒的可能性。一旦出现这种情况,即意味着将会给人类的生存和发展带来灾难性打击的流感大疫情的爆发。

参考文献:

- [1] 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;351:467-471.
- [2] Maines TR, Szretter KJ, Perrone L, et al. Pathogenesis of emerging avian influenza viruses in mammals and the host innate immune response. *Immunol Rev* 2008;225:68-84.
- [3] WHO. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/index.html. 2012.
- [4] 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;72:7367-7373.
- [5] Shinya K, Ebina M, Yamada S, et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 2006;440:435-436.
- [6] Buxton Bridges C, Katz JM, Seto WH, et al. Risk of influenza A (H5N1) infection among health care workers exposed to patients with influenza A (H5N1), Hong Kong. *J Infect Dis* 2000;181:344-348.
- [7] Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, et al. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med* 2004;350:1179-1188.
- [8] Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell SF, et al. Probable

person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N Engl J Med* 2005;352:333-340.

- [9] Wang H, Feng Z, Shu Y, et al. Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China. *Lancet* 2008;371:1427-1434.
- [10] Herfst S, Schrauwen EJ, Linster M, et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science* 2012;336:1534-1541.
- [11] Maher JA, DeStefano J. The ferret: an animal model to study influenza virus. *Lab Anim (NY)* 2004;33:50-53.
- [12] van Riel D, Munster VJ, de Wit E, et al. Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *Am J Pathol* 2007;171:1215-1223.
- [13] Sorrell EM, Wan H, Araya Y, et al. Minimal molecular constraints for respiratory droplet transmission of an avian-human H9N2 influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:7565-7570.
- [14] Imai M, Watanabe T, Hatta M, et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* 2012;486:420-428.
- [15] Munster VJ, de Wit E, van den Brand JM, et al. Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus in ferrets. *Science* 2009;325:481-483.
- [16] Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, et al. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science* 2009;325:484-487.
- [17] Yen HL, Lipatov AS, Ilyushina NA, et al. Inefficient transmission of H5N1 influenza viruses in a ferret contact model. *J Virol* 2007;81:6890-6898.
- [18] Hu J, Zhao K, Liu X, et al. Two highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses of clade 2.3.2.1 with similar genetic background but with different pathogenicity in mice and ducks. *Transbound Emerg Dis* 2012;60:127-139.
- [19] Marinova-Petkova A, Georgiev G, Seiler P, et al. Spread of influenza virus A (H5N1) clade 2.3.2.1 to Bulgaria in common buzzards. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1596-1602.
- [20] Choi JG, Kang HM, Jeon WJ, et al. Characterization of clade 2.3.2.1 H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from wild birds (mandarin duck and Eurasian eagle owl) in 2010 in Korea. *Viruses* 2013;5:1153-1174.
- [21] Tung DH, Van Quyen D, Nguyen T, et al. Molecular characterization of a H5N1 highly pathogenic avian influenza virus clade 2.3.2.1b circulating in Vietnam in 2011. *Vet Microbiol* 2013;165:341-348.