ARTIGO DE REVISÃO / *REVIEW ARTICLE*

Revisão das principais características epidémiológicas e virológicas do vírus influenza A(H5N1)

/ Helena Rebelo-de-Andrade
Investigadora Auxiliar
Coordenadora do Centro Nacional da Gripe e da Unidade de Vírus Respiratórios e Enterovírus
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Correspondência:
Helena Rebelo-de-Andrade
Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa
Portugal
Tel. +315 21 7526455
e-mail: h.rebelo.andrade@insa.min-saude.pt

/ Resumo

O vírus influenza A(H5N1) tornou-se enzoótico nas aves domésticas de algumas regiões do Sudeste Asiático onde estabeleceu múltiplas linhagens que reflectem linhas evolutivas diferentes relacionadas com o espaço geográfico onde circulam. Também, tem estado associado a extensas epizootias em aves domésticas e selvagens que atingiram uma dimensão e extensão geográfica sem precedentes. Estas epizootias estão relacionadas com casos esporádicos e *clusters* de doença grave no homem provocados principalmente pela transmissão zoonótica do vírus. Neste artigo é feita uma revisão das principais características epidemiológicas e virológicas do vírus A(H5N1), focando os seguintes aspectos: a evolução do vírus; as características demográficas e epidemiológicas dos casos confirmados de infecção humana; as principais vias de transmissão do vírus ao homem; o período de incubação e transmissibilidade; os determinantes da infecção humana pelo vírus A(H5N1) aviário e os principais determinantes da virulência.

Palavras-chave: Vírus influenza A(H5N1), epidemiologia, epizootia.

/ Abstract

Influenza virus A(H5N1) has become enzootic on domestic poultry from some regions of southeast Asia, where it forms several lineages that reflect the different evolutive branches related with the geographic space where they circulate. Also, they have been associated to extensive epizootic in domestic and wild poultry, which have spread without precedent. These episodes are related with sporadic cases and clusters of severe disease in humans, mainly caused by zoonotic transmission of the virus. In this article, a review of the main epidemiologic and virologic characteristics of the A(H5N1) virus is presented, focusing on the following aspects: virus evolution; demographic and epidemiological characteristics of the confirmed cases of human infection by this virus; main transmission routes to man; incubation and transmissibility periods; determinants of human infection by the avian A(H5N1) virus and the main determinants of virulence.

***Keywords**: Influenza virus A(H5N1), Epidemiology; epizooty.*

/ Gripe sazonal, gripe pandémica e epizootias de gripe aviária A(H5N1)

Estima-se que a gripe sazonal afecte, em cada ano, cerca de 1 a 15% da população mundial, ocasionando uma mortalidade que a OMS calcula entre 0,25 e 0,5 milhões de pessoas. Todos os Invernos, no hemisfério Norte, estas epidemias anuais de gripe são reconhecidas como uma das maiores causas de morbilidade e de aumento da mortalidade, especialmente entre os mais susceptíveis, onde se incluem as crianças, os idosos, os doentes crónicos ou com depressão do sistema imunitário.

Em contraste com as epidemias anuais, a gripe pode originar também pandemias que ocorrem de forma pouco frequente, em intervalos irregulares, como resultado da emergência, na espécie humana, de um novo vírus influenza A para o qual a população não apresenta imunidade. De facto, nos últimos 500 anos ocorreram 10 pandemias de gripe, numa média de 2 a 3 por século, das quais se destacam as três epidemias mundiais que surgiram no século XX: a gripe pneumónica, em 1918/1919, que provocou 20 a 40 milhões de mortes a nível mundial das quais cerca de metade se verificou no grupo etário dos 20 aos 40 anos, as pandemias de 1957/1958, conhecida como a gripe Asiática, e de 1968/1969, a gripe de Hong-Kong, que originaram cerca de 1,5 milhões de mortes e custos económicos directos, a nível mundial, superiores a 32 biliões de dólares.

Os vírus que estiveram nas etiologias das epidemias do século XX evoluíram a partir de vírus influenza de origem aviária, quer por recombinação entre os genomas de estirpes de vírus influenza humanos e vírus que infectavam as aves (pandemias de 1957/1958 e de 1968/1969) ou possivelmente através de adaptação, por mutação, de vírus influenza aviários à replicação directa na espécie humana (pandemia de 1918).

Apesar destes dois mecanismos de evolução dos vírus influenza serem hoje bem aceites, considerou-se durante muitos anos que os vírus influenza aviários se caracterizavam por uma gama restrita de hospedeiros que excluía a viabilidade e eficiência da transmissão directa destes vírus das aves ao homem.

No entanto, nos últimos 10 anos, aumentaram os casos documentados de transmissão zoonótica destes vírus como é exemplo o que aconteceu em Hong-Kong, em 1997 e 1999 com, respectivamente, o vírus A(H5N1) e A(H9N2), e na Holanda, em 2003, com o vírus (H7N7).

Mas, é a partir de 2003 que se desencadeou uma situação complexa do ponto de vista da saúde veterinária com o aparecimento, no Sudeste Asiático, de extensas epizootias provocadas pelo vírus A(H5N1) em aves domésticas e selvagens. Este vírus tornou-se enzoótico nas aves domésticas de algumas dessas regiões onde estabeleceu múltiplas linhagens que reflectem linhas evolutivas diferentes relacionadas com o espaço geográfico onde circulam. A estas epizootias têm sido associados casos esporádicos e *clusters* de doença grave no homem provocados principalmente pela transmissão zoonótica do vírus.

Já em 2006, ao mesmo tempo que diminuíram os casos notificados de doença humana na Ásia, o vírus A(H5N1) alargou as suas fronteiras, difundindo-se ao longo dos percursos migratórios, atingindo a Rússia e a Turquia onde causou, também, doença grave no homem. Difundiu-se, depois para a Europa e vários países Africanos.

As epizootias provocadas por este vírus atingiram, desta feita, uma dimensão geográfica sem precedentes aumentando, consequentemente, a população humana exposta e o risco de transmissão zoonótica.

A razão para o aumento do número de epizootias e do seu consequente impacto quer no âmbito da saúde veterinária quer humana é extremamente complexa e deve-se muito provavelmente à conjugação de um conjunto diversificado de factores, tais como: (1) maior conhecimento e capacidade de diagnóstico; (2) modificações nos sistemas de produção de aves de capoeira (áreas de produção de elevada densidade, muitas em sistema aberto e de produção integrada); (3) maior transparência na notificação e investigação da doença; (4) e, possivelmente, alterações nos padrões de migração de espécies selvagens como resultado das alterações climáticas.

Estamos, assim, perante um vírus influenza aviário do subtipo A(H5N1) cuja história natural comporta aspectos ecológicos e evolutivos notáveis. No entanto, apesar de circular há mais de 10 anos em diferentes espécies aviárias ocasionou pouco menos de três centenas de casos de infecção humana. É bem certo que a taxa de letalidade é elevada, mas continua a ser um problema de âmbito veterinário que enferma alguns riscos para a saúde humana. Nestas circunstâncias é fundamental investir numa vigilância da gripe na espécie humana e no âmbito da saúde animal (a nível mundial, nacional e regional) e em medidas de controlo das epizootias de gripe nas aves que incluam minimizar o risco da transmissão do vírus ao homem. [1]

/ Evolução do Vírus A(H5N1)

A evolução do vírus A(H5N1) caracteriza-se por múltiplas recombinações genéticas com origem num vírus percursor comum, que infectava gansos no sudeste asiático em 1997, e cujo genótipo dominante mais recente, designado genótipo Z, circula actualmente em galinhas e patos. Este genótipo foi responsável pelos casos de infecção humana de transmissão zoonótica registados em Hong Kong em 2003 e pelas epizootias que ocorrem em aves de capoeira desde 2004. [2,3,4,5,6]

Na sua evolução recente o vírus A(H5N1) tem aumentado a sua virulência, assim como tem expandido a gama de hospedeiros que inclui, para além das aves terrestres e aquáticas (domésticas e selvagens), algumas espécies de mamíferos. Sabe-se que o vírus causa infecção natural em tigres e leopardos e experimentalmente é possível induzir infecção em gatos. [3,4,5,6,7]

A maioria dos vírus A(H5N1) que têm circulado nas espécies aviárias nos últimos 4 anos podem dividir-se em grupos filogenéticos

distintos. Um primeiro grupo genético inclui os vírus que circulam no Cambodja, Tailândia e Vietname e que foram responsáveis pelos casos de infecção humana que ocorreram nesses países entre 2004 e 2005. Um segundo grupo, integra os vírus que infectaram as aves na China e Indonésia em 2003 e 2004 e que se difundiram para o Médio Oriente, Europa e África, durante 2005 e 2006. Este último grupo pode, por sua vez, ser subdividido em seis subgrupos genéticos dos quais três incluem as estirpes de vírus A(H5N1) aviário responsáveis pelos casos de infecção humana que ocorreram na Indonésia, em países do Médio Oriente, Europa e África, e na China.[8,9]

/ Características demográficas e epidemiológicas dos casos confirmados de infecção humana por vírus A(H5N1)

Segundo a OMS, durante os últimos quatro anos, isto é entre 2003 e 2007, observou-se um total de 274 casos de infecção humana por vírus A(H5N1), declarados a partir de 12 países, com uma taxa de letalidade associada de 60%. Em cada período de um ano registou-se um aumento cíclico de casos notificados durante os meses que correspondem à estação mais fria no hemisfério Norte. [10]

Os dados demográficos mostram que 90% dos casos de doença verificaram-se em indivíduos com menos de 40 anos e que a média da idade dos casos confirmados foi de18 anos. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas na distribuição por sexo nos diferentes grupos etários. [10]

A análise efectuada pela OMS mostra, ainda, que o intervalo médio entre o início dos sintomas e a hospitalização foi de quatro dias, sem diferenças estatisticamente significativas entre os casos em que se verificou a recuperação do doente ou a morte. Também não se registaram diferenças na mesma análise por género ou grupo etário.

O intervalo médio entre o início dos sintomas e a morte foi de 9 dias, sendo a taxa de letalidade mais elevada no sexo feminino (65%) e nos indivíduos entre os 10 e os 19 anos de idade (76%).[10]

Esta caracterização dos casos de infecção humana por vírus A(H5N1) têm limitações que advêm do pequeno número de casos analisados (essencialmente da Indonésia e do Vietname, os dois países com maior número de casos declarados), da estrutura etária da população, da organização dos serviços de saúde em cada país e da sensibilização dos profissionais de diversas áreas para o alerta e o diagnóstico destas situações de doença.

/ Principais vias de transmissão do vírus A(H5N1) ao homem

Apesar da dificuldade na recolha de dados epidemiológicos, fiáveis e detalhados, sobre todos os casos declarados de infecção humana por A(H5N1) existem evidências consistentes sobre a transmissão aves-homem constituir a principal fonte de infecção. De facto, a maioria dos casos de doença humana apresentou história de contacto directo e/ou exposição a aves mortas ou aves vivas, doentes ou infectadas (assintomáticas), na semana anterior ao início dos sintomas. Estão incluídos nesta via de transmissão o contacto próximo com galos de luta infectados e a manipulação de aves doentes ou infectadas destinadas à preparação de alimentos em condições de higiene deficiente.[3,7,11]

Também têm sido consideradas outras formas de transmissão da infecção, como por exemplo, através do consumo de aves infectadas (assintomáticas) ou do seu sangue mal cozinhados.

As evidências sobre a infecção humana através da exposição a ambientes contaminados (transmissão ambiente-homem) são limitadas pela dificuldade em identificar os principais factores ambientais de exposição. Contudo, atendendo à longa sobrevivência do vírus A(H5N1) no ambiente podem ser considerados diversos mecanismos de transmissão. Por exemplo, a exposição a fezes de aves infectadas (doentes ou assintomáticas), aumentando o risco com a sua utilização como fertilizantes, e a exposição a água contaminada, por fezes ou carcaças de aves infectadas, ou a inoculação directa dessa água via intranasal ou pela conjuntiva. Teoricamente, podemos ainda considerar a hipótese de transmissão através da contaminação das mãos por fómites.[3,7,11]

A transmissão pessoa a pessoa do vírus A(H5N1) de origem aviária é ineficiente. No entanto, pode ocorrer em situações excepcionais onde se verifique a exposição a uma carga viral suficientemente elevada que permita o desencadear da infecção como foi sugerido num caso de contacto próximo entre o filho e a sua mãe.

/ Período de incubação e de transmissibilidade do vírus A(H5N1)

A possibilidade de ocorrerem múltiplas exposições ao vírus A(H5N1), nos casos até agora descritos, dificultam a definição rigorosa de um período de incubação para a doença humana provocada pelo vírus aviário. No entanto, para as investigações de campo e vigilância de contactos a OMS recomenda que se considere um período de incubação de 7 dias, não deixando de alertar para o facto de se terem observado variações entre os 2 e os 17 dias.

Também não é fácil definir o período de transmissibilidade associado à infecção humana pelo vírus A(H5N1) que pode variar em função de diversos factores (grupo etário, estado imunitário do indivíduo infectado, carga viral do inóculo, etc.). Não obstante, para a generalidade dos casos, é possível considerar que a excreção do vírus por via respiratória se inicie um dia antes do início dos sintomas, atinja uma carga viral máxima entre o segundo e o quarto dia e se mantenha para além do sétimo dia após o início dos sintomas.

/ Determinantes da infecção humana pelo vírus A(H5N1) aviário

A especificidade da ligação da hemaglutinina (HA), uma das glicoproteínas de superfície dos vírus influenza, às glicoproteínas e glicolípidos da superfície da célula hospedeira é um dos factores

determinantes da infecção humana pelos diferentes subtipos de vírus influenza A.

De facto, os vírus da gripe sazonal ligam-se preferencialmente às células epiteliais não ciliadas do tracto respiratório humano que expressam predominantemente resíduos de ácido siálico ligado à galactose na configuração α-2,6. Em contrapartida, os vírus influenza de origem aviária, nomeadamente o vírus A(H5N1), têm maior afinidade para as células epiteliais ciliadas que contêm receptores na configuração α-2,3 (presentes, por exemplo, no epitélio intestinal das aves). Esta especificidade dos diferentes subtipos de vírus influenza para os receptores celulares foi durante muito tempo a explicação para a barreira das espécies estabelecida, teoricamente, entre os vírus aviários e humanos.

No entanto, trabalhos recentes demonstraram que existindo também, em menor quantidade, em regiões mais profundas do tracto respiratório humano células epiteliais ciliadas com receptores na configuração α-2,3, a infecção pelo vírus A(H5N1) pode aí estabelecer-se. Contudo, esta infecção via células ciliadas (dada a sua quantidade, distribuição e metabolismo) não é óptima para a replicação viral o que justifica, parcialmente, a necessidade de exposição a uma carga viral elevada para que se estabeleça a infecção humana por vírus de origem aviária e também porque é ineficiente a transmissão pessoa a pessoa do vírus A(H5N1).

Mas, para que este vírus possa saltar a barreira das espécies de forma eficaz, alterando a sua especificidade para o receptor de ligação, é suficiente que ocorram uma a duas mutações chave (Q226L e G228S) na região mais distal da molécula da HA onde se situa a bolsa de ligação à célula hospedeira.[12] Perante esta possibilidade a questão que se coloca prende-se com a hipótese de este vírus ter ou não potencial para, nas futuras infecções humanas, seleccionar populações onde estas mutações surjam de forma natural facilitando, deste modo, a sua transmissão pessoa-a-pessoa e desencadeando uma nova epidemia mundial. Este mecanismo evolutivo, em que um vírus puramente aviário passa a reconhecer os receptores celulares humanos, pode estar na origem de um vírus pandémico (como por exemplo o da pandemia de 1918) e designa-se por mutação adaptativa.

Como é do conhecimento geral, o outro processo que explica o aparecimento de um vírus pandémico é a recombinação entre os genomas de vírus influenza das aves e humanos. Neste caso, a presença de ambos os receptores, α-2,3 e α-2,6, nas células do epitélio da traqueia dos suínos é a razão porque estes animais podem servir como reservatório de recombinação, estando na génese dos vírus das pandemias de 1957/1958 e de 1968/1969.

Recentemente, foi também levantada a hipótese das aves de capoeira poderem vir a desempenhar o mesmo papel uma vez que possuem ambos os tipos de receptores nas células epiteliais do pulmão e intestino.[7,12,13]

/ Determinantes da virulência do vírus A(H5N1)

A virulência dos vírus influenza A está associada a uma constelação de genes. Várias proteínas específicas, através da sua acção individual e/ou através das suas interacções funcionais com outras proteínas do hospedeiro ou virais, desempenham papeis importantes na definição da virulência destes vírus em diferentes hospedeiros.

A virulência dos vírus do subtipo A(H5N1) está, possivelmente, associada aos seguintes factores: (1) HA com uma inserção de aminoácidos polibásicos na região de clivagem que permite a sua activação por proteases ubíquas; (2) função da subunidade PB2 da polimerase do virião, muito em particular ligada ao aminoácido na posição 627; (3) relação da proteína não estrutural NS1A com a indução de citoquinas; (4) e aos determinantes da apoptose celular.

/ Papel da HA na virulência

A clivagem do percursor HA0 da HA em duas subunidades, HA1 e HA2, é um pré requisito para o início da infecção e um determinante decisivo da virulência.

Nos vírus A(H5N1), de elevada patogenia, a virulência está associada à presença de uma inserção de aminoácido polibásicos na região de clivagem que facilitam à activação da HA por proteases segregadas intracelularmente (ex. furina) e que são ubíquas no hospedeiro. Como consequência, a clivagem da hemaglutinina é mais eficiente e pode ocorrer em diferentes tipos de tecido.

Ao contrário, os vírus do subtipo A, com hemaglutininas H1, H2 e H3 cujas linhagens estão bem estabelecidas na espécie humana, contêm no local de clivagem uma arginina e a activação da HA desses vírus faz-se através de uma protease extra celular (idêntica à tripsina) que é segregada no tracto respiratório, limitando a eficiência da infecção a estes tecidos.

Ainda, nos vírus A(H5N1), é possível que o grau de virulência das diferentes estirpes possa ser modulado por aminoácidos localizados noutras regiões da hemaglutinina. Por exemplo, a presença de cadeias carboxiladas na proximidade da região de clivagem pode limitar a acessibilidade desta região à activação pelas proteases, resultando numa estirpe não virulenta.

Por outro lado, a neuraminidase (NA) (que constitui a segunda glicoproteína de superfície dos vírus influenza) no seu equilíbrio com a hemaglutinina pode também afectar a virulência. Um dos mecanismos prende-se com a ligação e sequestro do plasminogénio celular que, activado, participa na clivagem da HA.

/ Papel da subunidade PB2 da polimerase do virião na virulência

A RNA polimerase dos vírus influenza A integra as subunidades PB1, PB2 e PA e está estreitamente ligada à virulência dos vírus A(H5N1) aviários. É possível que, no genoma deste vírus, o aminoácido na posição 627 da PB2 desempenhe duas funções essenciais: (1) seja

determinante para a interacção da polimerase com factores do hospedeiro que diferem nos mamíferos e nas aves; (2) determine a sensibilidade para a temperatura óptima de actividade da RNA polimerase viral. De facto, a replicação viral ocorre a temperaturas diferentes nos mamíferos e nas aves. Isto é, a multiplicação dos vírus influenza humanos no tracto respiratório superior acontece aproximadamente a 30ºC, enquanto os vírus aviários replicam no tracto intestinal a uma temperatura de 41ºC. Esta sensibilidade da polimerase à temperatura é determinada pela presença de Glu no lugar da Lys na posição 627 da PB2. [2,11,13,14]

/ Relação da proteína não estrutural NS1 com a virulência

A NS1 é uma pequena proteína multifuncional que apesar de ser sintetizada na célula hospedeira não é incorporada na partícula viral. Tem sido sugerido que esta proteína está envolvida na virulência em dois processos essenciais da resposta imunitária. Primeiro, pode contribuir para a indução das quimoquinas e citoquinas produzidas pelas células epiteliais infectadas e pelos monócitos/macrófagos (propriedade esta que é independente do aminoácido localizado na posição 92 da NS1) durante a resposta pró-inflamatória. Segundo, apesar da produção de níveis elevados de citoquinas, a produção de IFN-ß é substancialmente reduzida sem, no entanto, ser totalmente inibida. Para estes processos contribui a proteína NS1 que, na vasta maioria dos vírus A(H5N1), contêm uma sequencia ESEV na região carboxil terminal que medeia a ligação a proteínas que possuem um domínio PDZ (múltiplas proteínas humanas reguladoras e de sinal) provocando a disrupção do metabolismo da célula infectada e da organização celular. Desta forma a NS1 pode ligar-se e inibir a função de duas proteínas celulares necessárias para a modificação da região 3´do mRNA e consequentemente reduzir a produção do mRNA interferão-ß.[2,11,13,14] Pensa-se que a limitada eficácia da resposta imunitária inata desencadeada pelo vírus da pandemia de 1918 possa ter estado relacionada com a adaptação da NS1 para suprimir eficientemente o sistema IFN- α/ ß permitindo uma replicação quase irrestrita do vírus.

Determinantes da apoptose celular

Os vírus influenza A induzem a apoptose, ou seja, a morte celular programada que se caracteriza por uma desintegração da estrutura e fragmentação do DNA celular mediada por proteases. Este processo contribui para a virulência uma vez que permite que o vírus utilize toda a maquinaria celular para a sua replicação antes de desencadear de forma programada a morte da célula hospedeira. Três proteínas codificadas pelo vírus são descritas como tendo funções apoptóticas: a NA, directa ou indirectamente, por activação do factor de crescimento ß (TGF-ß) que funciona como indutor da apoptose; a proteína NS1 com actividade antiapoptótica, ou seja, na ausência de NS1 há aumento da síntese de IFN pela célula hospedeira que potencia a apoptose; a PB1-F2 que destrói as células imunitárias (monócitos) que são desenvolvidas como resposta à infecção viral. [2,11,13,14]

/ Comentário final

A epidemiologia do vírus A(H5N1) sofreu modificações drásticas nos últimos quatro anos como consequência da dificuldade em controlar a infecção em aves domésticas, devido a modificações nos sistemas de produção e industrialização de aves e, possivelmente, como resultado de alterações nos padrões de migração das aves selvagens fruto das modificações climáticas. Não é claro se este vírus A(H5N1) vai desenvolver e manter o potencial para se tornar enzoótico nalgumas regiões do Sudeste Asiático ou vai, natural e progressivamente, desaparecer da circulação nas espécies que actualmente infecta. Mas, tendo em consideração o seu potencial zoonótico é essencial reduzir a população humana exposta e consequentemente minimizar o risco dessa transmissão. Nestas circunstâncias é fundamental investir numa vigilância da gripe na espécie humana e no âmbito da saúde animal, a nível mundial, nacional e regional e em medidas de controlo da epizootias nas aves.

/ Bibliografia

1. Rebelo-de-Andrade H. Introdução aos conceitos de gripe sazonal, gripe pandémica e de gripe aviária. In Rebelo-de-Andrade et al, Gripe sazonal, de transmissão zoonótica e pandémica. Diagnóstico Laboratorial. INSA, 2006, pg. 5-9.

2. Chen H, Smith G, Li K, Wang J, Fan X, Rayner J, Vijakrishna D, et al. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: Implications for pandemic control. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103 (8):2845-2850.

3. Alexander D. An Overview of the Epidemiology of avian influenza. Vaccine 2006; Nov 9 [Epub ahead of print].

4. Juckett G. Avian Influenza: preparing for a pandemic. Am Fam Physician 2006 ;74(5):783-790.

5. Webster R, Peiris M, Chen H, Guan Y. H5N1 outbreaks and enzootic influenza. Emerg Infect Dis 2006; 12(1):3-8.

6. WHO Global Influenza Program Surveillance Network. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. Emerg Infect Dis 2005; 11(10):1515-1521.

7. Jong M, Hien T. Avian Influenza A(H5N1). J Clin Virol 2006; 35 (1):2-13.

8. Chen G, Chang S, Mok C, Lo Y, Kung Y, Huang J, Shih Y, et al. Genomic signatures of human versus avian influenza A virus. Emerg Infect Dis 2006; 12(9):1353-1360.

9. Smith G, Naipospos T, Nguyen T, Jong M, Vijaykrishna D, Usman T, et al. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. Virology 2006; 350 (2):258-268.

10. WHO. Weekly Epidemiological Record, 9 February 2007.

11. Wong S, Path M, Yuen K. Avian Influenza Virus Infections in Humans. Chest 2006; 129 (1):156-168.

12. Thompson C, Barclay W, Zambon M, Pickles R. Infection of human airways epithelium by human and avian strains of influenza A virus. J Virol 2006 ;80(16):8060-8068.

13. Lewis D. Avian Flu to Human Influenza. Annu Rev Med 2006;57:139-154.

14. Krug R. Clues to the virulence of H5N1 viruses in humans. Science 2006; 311 (5767):1562-1563 .