

DOI: 10.13376/j.cbls/2015069

文章编号: 1004-0374(2015)05-0525-06



刘金华, 长江学者特聘教授, 国家杰出青年科学基金获得者, 山东省重大动物疾病防控泰山学者, 享受国务院政府特殊津贴。担任农业部全国动物防疫专家委员会禽流感专家组副组长, 科技部禽流感科技攻关病原组专家组成员, 卫生部人感染 H7N9 禽流感联防联控专家组成员。长期致力于流感病毒的研究, 围绕动物流感病毒遗传演化、致病机理和防控技术等开展系列研究工作, 并取得了重要突破。在 *Science*、*PNAS*、*Lancet*、*JVI* 等国际权威 SCI 杂志以第一作者和 (或) 通讯作者发表 SCI 论文 40 余篇。

H5N1亚型禽流感病毒的流行与致病性

孙洪磊, 刘金华*

(中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

摘要: H5N1 禽流感病毒在禽类中广泛流行, 对家禽养殖业造成严重经济损失。1997 年香港地区首次出现人感染 H5N1 禽流感病例, 2003 年之后多个国家相继出现 H5N1 禽流感病毒感染人事件, 目前已有 16 个国家 650 人感染发病, 患者死亡率高达 60% 以上。随着 H5N1 禽流感病毒的持续流行与进化, 该病毒仍然对公共卫生具有严重威胁。综述了 H5N1 禽流感病毒的进化特点、流行情况以及致病性。

关键词: H5N1 亚型禽流感病毒; 流行性; 传播性; 致病性

中图分类号: Q939.4; R373.1 文献标志码: A

Epidemicity and pathogenicity of avian influenza A H5N1 virus

SUN Hong-Lei, LIU Jin-Hua*

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Highly pathogenic influenza A (H5N1) virus causes a widespread poultry deaths worldwide. The first human H5N1 infected case was reported in Hong Kong Special Administrative Region of China in 1997. Since then, the virus re-emerged in 2003 and continues to infect people worldwide. Currently, over 650 human infections have been reported in more than 16 countries and mortality rate is greater than 60%. These viruses continue pose a potential pandemic threat in the future because of the continuing global spread and evolution. This review focuses on the evolution of H5N1 virus, the epidemiological of H5N1 virus in poultry, clinical and virological characteristics of human H5N1 case.

Key words: H5N1 avian influenza virus; epidemicity; transmission; pathogenicity

禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 为正黏病毒科单股负链 RNA 病毒^[1]。其基因组由 8 个分节段的 RNA 组成, 每个片段编码 1~2 个蛋白质, 分别为 PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2、NS1 和 NS2, 近年来发现流感病毒还可以编码 PB1-F2、

PB1-N40、PA-X、PA-N155、PA-N182、M42 和 NS3 等蛋白^[2-4]。流感病毒的结构可分为 3 层。最

收稿日期: 2014-11-06

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(31025029)

*通信作者: E-mail: ljh@cau.edu.cn

外层为双层类脂囊膜,在囊膜表面有许多放射状排列的纤突,即呈棒状的血凝素(hemagglutinin, HA)蛋白和呈蘑菇状的神经氨酸酶(neuraminidase, NA)蛋白。HA蛋白的主要功能是结合宿主细胞唾液酸受体并帮助病毒穿透宿主细胞膜,NA蛋白主要通过水解病毒和细胞表面的唾液酸残基,促进病毒粒子的释放以及防止子代病毒粒子聚集。此外,囊膜上还存在离子通道蛋白M2。中间层是病毒中含量最大的M1蛋白,主要功能是维持病毒粒子的形态。病毒内部是由RNA聚合酶复合体(PB2、PB1、PA和NP蛋白)和病毒RNA相连形成的vRNP复合体,负责病毒RNA的复制和转录。具有抑制干扰素作用的非结构蛋白NS1在感染的细胞中较丰富,但没有装配到病毒粒子的结构中。PB1-F2蛋白与诱导细胞凋亡相关。最近发现的PA-X蛋白与诱导宿主免疫反应和致病性相关^[2]。

根据HA和NA蛋白抗原性差异可将流感病毒分为各种不同的亚型。迄今为止,共有18种HA(H1~H18)和11种NA(N1~N11)亚型被鉴定^[5]。H1~H16、N1~N9亚型的流感病毒均来自野生水禽,H17N10、H18N11两种病毒分离自蝙蝠。根据AIV对鸡的致病性,可将其分为高致病性和低致病性两类。低致病性禽流感病毒对家禽几乎无致病性或感染后症状比较温和,但高致病性禽流感病毒(highly pathogenic avian influenza viruses, HPAIV)能造成感染家禽的全身系统性感染,引起家禽较高的死亡率^[6]。目前HPAIV仅存在于部分H5和H7亚型。

1996年,中国广东的一家鹅场首次爆发H5N1 HPAI疫情,此后该病毒在东南亚地区家禽中呈地方流行性,目前H5N1 AIV已蔓延到全世界范围内的60多个国家,每一次爆发都可导致大规模的家禽死亡或淘汰,给养禽业带来毁灭性的打击;一些H5N1 AIV甚至能够引起野生水禽的发病死亡^[7-8]。H5N1 AIV之所以引起人们巨大的恐慌,除了其对禽类的高致病性外,还因为其能跨种间传播感染人,且感染者死亡率高达60%以上。虽然目前尚无直接证据表明H5N1病毒能够在人际间发生有效传播,但随着H5N1 AIV的持续流行与进化,该病毒仍然对公共卫生具有严重威胁。本文综述了H5N1 AIV的基因进化特点、流行情况以及致病性。

1 H5N1亚型禽流感病毒的基因进化

1.1 基因型的进化

流感病毒存在抗原漂移(antigenic drift)和抗原

转变(antigenic shift)两种变异机制改变其抗原性,病毒在流行过程中一直伴随着不断的基因突变和基因重排。类似于其他亚型禽流感病毒,H5N1 HPAIV自1996年首次出现后(A/goose/Guangdong/1/96)也一直处于不断变异中。1997年,H5N1亚型AIV在香港鸡群中爆发,并导致18人感染,其中6人死亡。病毒基因分析显示,香港爆发的H5N1病毒其HA基因来源于A/goose/Guangdong/1/96,其他基因则来源于其他亚型AIV^[9]。自1999年开始,H5N1 HPAIV持续存在于我国南方地区并经历了频繁的基因重排,产生众多基因型病毒。截至2001年,香港和中国大陆地区共分离到8个基因型的H5N1病毒,分别为A、B、C、D、E、X₀、W和Z基因型^[10]。2002~2003年,又出现3个主要的基因型(Y、Z⁺、V)。2004年,Z基因型和W基因型病毒重排产生了一种新的G基因型病毒。虽然出现了众多基因型的病毒,但仅有少数基因型的病毒(B、Z、Z⁺、V、G、W和X₀)能够流行超过2年以上。

自2002年开始,Z基因型开始成为中国家禽中的优势毒株。但2005年以后,以Fujian-like为代表的V基因型取代了Z基因型,成为我国家禽中的优势基因型病毒,随后传入香港、老挝、马来西亚和泰国,引起家禽疫情爆发^[11]。2005年从越南家禽中分离到G基因型的H5N1病毒,因其与同年中国广西省监测到的一株病毒同源性较高,所以很可能是由中国传入的^[11]。在印度尼西亚和柬埔寨只流行Z基因型的H5N1病毒,但近年的分子流行病学调查结果显示Z基因型病毒也开始出现基因重排现象^[12]。除2006年分离到一株V基因型的病毒外,泰国出现的H5N1病毒均为Z或Z⁺基因型^[13]。2003年,老挝分离到Z基因型的H5N1病毒,2007年出现了V基因型的病毒,基因分析显示与2006年泰国出现的V基因型病毒是同一来源^[14]。

1.2 HA基因的进化

由于用基因型对病毒进行定义相对复杂,不便于来自全球不同实验室的流感监测数据进行统一比对,世界卫生组织(WHO)、联合国粮农组织(FAO)和世界动物卫生组织(OIE)联合制定了一个基于HA基因核苷酸序列对H5N1亚型禽流感病毒统一命名的准则^[15],将H5亚型AIV分为10个Clade,分别为Clade 0~9,而部分Clade又可分为不同的subclade,如Clade 2又分为2.1、2.2、2.3、2.4和2.5,2.1可再被分为2.1.1、2.1.2、2.1.3,2.3可再被分为2.3.1、2.3.2、2.3.3和2.3.4等。

Clade 0 的毒株是早期香港和中国大陆流行的主要毒株, 现在已较少见。Clade 1 的毒株主要流行于泰国、越南、马来西亚、老挝和柬埔寨, 既能感染禽又能感染人。Clade 2.1 的毒株是印度尼西亚地区主要流行的毒株, 该分支病毒对人的致病性明显强于其他分支病毒; Clade 2.2 的毒株首次于 2005 年在青海湖发病的野生候鸟中发现^[7-8], 目前主要流行于埃及等中东国家; Clade 2.3 的毒株主要分布于中国、越南、泰国、老挝和马来西亚等东南亚地区, 其中流行于我国的病毒即属于 2.3.4 分支; 2.3.2 分支病毒近年来流行性非常广泛, 除了引起家禽发病, 还能感染候鸟^[16], 且随着候鸟的迁徙, 在蒙古、日本、韩国、中国以及东南亚地区广泛流行; Clade 2.4 病毒主要来源于我国的云南及广西地区; Clade 2.5 病毒则以韩国、日本以及我国的汕头地区分离株为主。Clade 7 分离株是我国北方鸡群中主要流行的分离株, 2006 年山西发生的 HPAI 疫情即由该分支的毒株感染造成^[17]。其他分支的病毒流行的地域范围较小, 主要分布于越南和我国的广西及香港等地区。

2 H5N1亚型禽流感病毒在禽类中的流行情况

2.1 H5N1亚型禽流感病毒在野鸟中的流行情况

所有亚型的 A 型流感病毒 (除 H17N10、H18N11) 均可在水禽中分离到, 通常 A 型流感病毒在自然宿主中不会引起发病表现。自 1996 年首次发现 H5N1 HPAIV 直到 2005 年, H5N1 AIV 主要发生于家禽和少数与患病家禽接触的非迁徙鸟。然而, 2005 年以后, 发生了多起迁徙候鸟感染高致病性 H5N1 AIV 发病死亡的事件。

2005 年 5 月初, 中国西部地区的青海湖国家自然保护区 (迁徙候鸟的繁殖场地) 的迁徙候鸟大规模发病、死亡事件引起了人们极大的关注。本研究室首次从发病斑头雁中分离到了 Clade 2.2 分支 H5N1 AIV^[7], 这次事件的发生改变了人们长期以来认为水禽只带毒不发病的观念。此次疫情持续近 2 个月, 超过 6 000 只迁徙候鸟死亡, 导致全球斑头雁数目减少约 10%, 表明该病毒对易感野生禽类具有严重危害。陈化兰研究团队发现 2005 年 8 月以后从蒙古国、俄罗斯以及中国内蒙古和辽宁省分离到的 H5N1 AIV 与从青海湖分离到的病毒在基因上密切相关, 说明 H5N1 AIV 可以通过候鸟迁徙从而传播到其他地区^[8]。

最近的一次野鸟爆发 H5N1 HPAI 疫情是在 2009 年 5 月, 疫情导致青海省海南藏族自治州共和

县更尕海的 121 只野鸟死亡。研究发现该病原并非为几年前的 Clade 2.2 分支病毒, 而是东南亚及我国家禽中广泛存在的 Clade 2.3.2 分支病毒^[16]。

近年来, H5N1 HPAI 疫情频繁在野鸟内爆发需要引起足够的重视, 一方面 H5N1 HPAI 疫情的爆发对野生鸟类尤其是珍惜鸟类的生存构成威胁; 另一方面, 感染 H5N1 AIV 的野鸟在迁徙过程中很容易将病毒传播到世界各地。因此, 有必要加强对野鸟 H5N1 AIV 的监测力度。

2.2 H5N1亚型禽流感病毒在家禽中的流行情况

1996 年我国发生的 H5N1 亚型禽流感得到了及时控制, 但从 1999 年起, H5N1 AIV 又在我国南方的家鸭等水禽中持续流行。2000 年后, H5N1 AIV 发生了频繁的基因重排, 产生了许多不同的基因型病毒^[18]。2004 年上半年, 我国 16 个省份的家禽 (鸡、鸭、鹅) 爆发了高致病性 H5N1 禽流感疫情。2006 年, Smith 等^[10]通过对中国南方活禽市场的监测, 发现 Fujian-like, 即 Clade 2.3.4 分支的病毒逐渐在中国南方成为优势毒株, 并传播到中国香港、老挝、马来西亚和泰国。2005~2006 年, 我国发生了多起 H5N1 HPAI 疫情。此后, 由于实行强制免疫和扑杀的政策对 H5N1 AIV 进行防控, 2007~2009 年, 我国家禽发生了数量有限的几起 H5N1 HPAI 疫情。截至 2014 年 6 月, 我国共报道发生了 127 起 H5N1 HPAI 疫情。

2003 年末, H5N1 AIV 传播到东南亚国家。2004 年, 越南爆发了第一起 H5N1 HPAI 疫情, 由于政府采取了免疫措施, 在接下来的两年没有发生 H5N1 HPAI 疫情, 直到 2007 年 6 月, H5N1 HPAI 疫情再次爆发。通过对 2005~2007 年分离毒株的进化分析表明, 在北越 Clade 2.3.4 分支病毒已经取代了 Clade 1 分支病毒, 在南越仍可以检测到 Clade 1 分支的病毒, 且这两个分支的病毒已经发生了基因重排^[19]。2004 年 1 月, 泰国第一次报道了家禽发生 H5N1 HPAI 疫情, 随后泰国的数个省份发生了多起 H5N1 HPAI 疫情。2004 年 1 月, 柬埔寨第一次爆发 H5N1 HPAI 疫情, 并在同年再次发生了 14 起高致病性 H5N1 AI 疫情^[20]。老挝、印度尼西亚、韩国、日本、马来西亚、缅甸六国在 2003 年之后相继爆发了 H5N1 HPAI 疫情。

非洲首次报道 H5N1 HPAIV 疫情是在 2006 年早期^[21]。2006 年 1 月中旬, 尼日利亚的卡杜纳州爆发了非洲首次 H5N1 HPAI 疫情, 在不到一个月的时间内, H5N1 AIV 传播到了埃及、尼日尔、喀

麦隆。2006年4月至2007年12月,苏丹、布基纳法索、吉布提、科特迪瓦、加纳、多哥、贝宁等国也相继发现了H5N1 AIV。通过对分离病毒的基因进化分析表明,所有流行于非洲的H5N1 AIV均属于Clade 2.2。

在欧洲,H5N1 AIV主要在野鸟体内发现,除俄罗斯、罗马尼亚和乌克兰等国,家禽爆发H5N1 HPAI疫情相对较少。

随着候鸟迁徙以及人类活动,H5N1 AIV已散播到东亚、东南亚、欧洲、非洲的60多个国家和地区,并在许多国家和地区的家禽中呈现地方流行,给养禽业的健康发展以及人类公共卫生安全均造成了巨大挑战。

3 人感染H5N1禽流感病毒情况

1997年,香港发生的H5N1 AIV直接感染人事件,引起了全世界的震惊和关注。2003年末,H5N1亚型AIV开始影响到亚洲东部地区和东南亚地区^[18],自2003年12月,越南、泰国、印度尼西亚和中国等亚洲国家相继出现H5N1 AIV感染人的病例。截至2014年7月27日,H5N1流感病毒已在亚洲、欧洲、非洲和美洲的16个国家造成了667例感染,其中393例死亡。

目前为止共有4个Clades,包括Clade 0、1、2和7的H5N1病毒曾感染过人类。2003~2005年,东南亚地区感染人类的主要是Clade 1分支的病毒。2004~2005年,Clade 2分支的H5N1 AIV在亚洲、欧洲、中东以及非洲的家禽及野生禽类中广泛流行。目前,Clade 2.1分支病毒在印度尼西亚感染人类发病,Clade 2.2分支的病毒在非洲及中东地区引起人类发病,Clade 2.3分支的病毒在中国及周边的东南亚国家流行,是引起人类感染发病的主要病毒。

4 H5N1病毒的传播

人类感染H5N1 AIV的主要传染源为携带病毒的禽类,大部分人类感染者都曾与病禽或携带病毒的家禽发生过直接或间接的接触,且其中相当一部分人曾出入过活禽交易市场。H5N1 AIV感染禽类后表现出系统性复制,禽类的分泌物、排泄物以及多种组织器官中均带有病毒。通过直接与病禽的接触(包括宰杀、拔毛和加工被感染禽类),H5N1 AIV可以经由人的呼吸道、消化道、皮肤黏膜损伤处以及眼结膜直接传播到人,其中以呼吸道传播为主^[22]。也有报道称H5N1 AIV可以通过污染的环境,

如污染的水,间接地传播给人,但传播效率很低^[23]。目前认为人类对H5N1 AIV还不易感,食用或加工健康禽类产品还没有高感染风险。

H5N1 AIV能否形成大流行的前提取决于其能否通过气溶胶的形式在人际间传播。目前还没有H5N1 AIV在人群之间可以通过气溶胶的方式有效传播的报道。尽管有聚集性发病的报道^[24],但这些聚集性发病的病例90%以上都有血缘关系,这可能与感染患者之间无防护措施的密切接触有关,也暗示H5N1 AIV易感人群可能存在某些基因特异性。此外,还有H5N1 AIV发生垂直传播的个例报道^[25],病毒可经由胎盘从孕妇垂直传播感染胎儿,但垂直传播在临床上发生的概率很小。

5 H5N1禽流感病毒的致病机制

人感染H5N1病毒后引起的肺脏急性损伤导致的呼吸窘迫综合征是导致患者高死亡率的主要原因。H5N1病毒对人高致病性的机制可能有如下几方面:(1)病毒肺外全身系统性感染;(2)大量病毒长时间复制导致细胞损伤;(3)H5N1病毒易感染II型肺泡上皮细胞和肺泡巨噬细胞;(4)宿主过强的免疫反应。这些症状的出现既有病毒的因素也有宿主因素。

5.1 病毒因素

流感病毒的组织嗜性差异是引起不同致病表型的重要因素。季节性流感病毒主要亲嗜气管、支气管的纤毛上皮细胞,这种结合方式导致季节性流感的一系列症状(鼻炎、咽喉炎、气管炎等)^[26]。相比之下,H5N1 AIV感染人类的主要靶细胞包括II型肺泡上皮细胞、肺泡巨噬细胞以及支气管的非纤毛上皮细胞^[27]。病毒对II型肺泡上皮细胞的感染导致肺泡表面活性物质分泌量减少,并降低肺泡上皮细胞的再生修复功能,而对肺泡巨噬细胞的感染则导致肺脏先天性免疫反应降低并引起过强的炎症反应。此外,病毒在肺外组织的大量复制也是导致病情加重的原因之一,大多数死亡病例能够在血液、脑脊液以及其他肺外脏器中检测到病毒^[28]。

通过反向遗传操作技术,人们对流感病毒致病性的分子基础了解得更加深入。HA裂解为HA1和HA2是流感病毒具备感染性的前提条件,HA多碱性氨基酸裂解位点不仅是病毒在禽类多系统感染的分子基础,也与病毒对哺乳动物的毒力相关。研究证明,裂解位点P6位氨基酸突变为丝氨酸时,H5N1病毒对哺乳动物的致病性增强^[29]。受体结合

区氨基酸变异也与病毒毒力有关, S227N 变异协同 158 位去糖基化能够降低 H5N1 病毒对小鼠的致病力及全身散播能力^[30]。PB2 基因是禽流感病毒跨种间传播感染哺乳动物最重要的分子基础。一般情况下, 禽流感病毒 PB2 627 位氨基酸为谷氨酸(E), 而人源禽流感病毒为赖氨酸(K), 研究表明, PB2 E627K 能够增强病毒在哺乳动物细胞中以及小鼠体内的复制能力^[31]。PB2 蛋白 D701N 突变也能增强 H5N1 病毒对哺乳动物的毒力和传播能力^[32], 这可能与该位点突变能够增强 PB2 蛋白与哺乳动物细胞中 importin- α (核输入蛋白) 的结合能力有关^[33]。

5.2 宿主因素

宿主在感染 H5N1 流感病毒后很快产生先天性和特异性免疫抵抗病毒感染, 然而过度或者失调的免疫应答可能对宿主起到免疫损伤的副作用。通过对人感染 H5N1 病例分析发现, 患者血浆中巨噬细胞趋化蛋白、中性粒细胞趋化蛋白以及炎性细胞因子水平(IL-6、IL-8、IFN- α 、TNF- α 等)均出现明显升高, 且死亡患者血浆中的炎性细胞因子水平明显高于生存患者^[28]。为了揭示这种宿主过强的免疫反应是由病毒过量复制引起的还是 H5N1 病毒本身具有诱导宿主过强免疫反应的能力, 人们利用体外培养的细胞系进行了相关研究。鉴于 II 型肺泡上皮细胞和肺泡巨噬细胞是 H5N1 病毒感染的主要靶细胞^[25], 这两种细胞是体外研究 H5N1 病毒致病机制的主要细胞模型。研究发现, 相比于季节性流感病毒, H5N1 病毒感染巨噬细胞引起的 TNF- α 、IFN- α 、IL-1 β , 以及 CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCXL10 等趋化因子的表达量更高^[34]; 在肺泡上皮细胞上, H5N1 病毒引起更高水平的 CXCL10、IL-6、IL-8、CCL2、CCL5 及 IFN- β 表达量^[35]。而 H5N1 病毒与普通季节性流感病毒的复制性并没有显著差异, 这说明刺激产生高细胞因子不是由病毒复制引起的, 病毒本身的特性可能是诱导高细胞因子的主要原因。同时还发现, 并不是所有 H5N1 病毒都能刺激巨噬细胞产生高细胞因子, 不同分支的 H5N1 病毒诱导巨噬细胞产生细胞因子的能力存在差异^[36]。多种细胞因子的高表达对于抗病毒有一定作用, 但过量的细胞因子产生导致肺泡毛细血管通透性升高, 大量浆液渗出; 过量免疫细胞向肺脏聚集, 导致肺脏实变; 引起外周血淋巴细胞下降, 骨髓造血细胞减少等, 不利于机体快速建立获得性免疫反应; 而且过强的炎症反应可能介导了重症患者的全身炎症反应综合征、呼吸窘迫综合征以及多器官功能衰竭。

6 结语

H5N1 HPAIV 在全世界的广泛流行, 严重影响了家禽养殖业的健康发展, 造成了巨大的经济损失, 而且 H5N1 AIV 的持续流行对人类公共卫生安全带来严重威胁。一方面, 人类感染 H5N1 AIV 往往发展为重度的病毒性肺炎或呼吸窘迫综合征, 致死率较高; 另一方面, H5N1 AIV 具有形成大流行流感的潜力。目前人类普遍缺乏针对 H5 亚型 AIV 的抗体, 一旦 H5N1 AIV 获得人际间有效传播的能力, 将给人类带来巨大的灾难。最近研究表明, 在实验条件下 H5N1 病毒能够通过点突变或者基因重排获得在雪貂间飞沫传播的能力^[37-38]。H5N1 AIV 持续的流行以及对哺乳动物的感染为其获得哺乳动物适应性突变提供了条件。更值得注意的是, 近年来 H5N1 AIV 与其他亚新流感病毒发生基因重排的频率明显加快, 已出现 H5N2、H5N5、H5N8 等多种亚型 HPAIV^[39-41], 频繁的基因重排增加了出现适应人类的 H5 亚型 HPAIV 的几率。因此, 应进一步加强 H5 亚型 AIV 的监测力度, 开展致病机制的相关研究, 开发有效疫苗及防治药物, 减少其对人类的危害。

[参 考 文 献]

- [1] Neumann G, Chen H, Gao GF, et al. H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties. *Cell Res*, 2009, 20(1): 51-61
- [2] Jagger B W, Wise HM, Kash JC, et al. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*, 2012, 337(6091): 199-204
- [3] Wise HM, Hutchinson EC, Jagger BW, et al. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS Pathog*, 2012, 8(11): e1002998
- [4] Selman M, Dankar SK, Forbes NE, et al. Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing. *Emerg Microbes Infect*, 2012, 1(11): e42
- [5] Wu Y, Wu Y, Tefsen B, et al. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol*, 2014, 22(4): 183-91
- [6] Klenk HD, Garten W. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol*, 1994, 2(2): 39-43
- [7] Liu J, Xiao H, Lei F, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science*, 2005, 309(5738): 1206
- [8] Chen H, Li Y, Li Z, et al. Properties and dissemination of H5N1 viruses isolated during an influenza outbreak in migratory waterfowl in western China. *J Virol*, 2006,

- 80(12): 5976-83
- [9] Chan PK. Outbreak of avian influenza A (H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clin Infect Dis*, 2002, 34(Supplement 2): S58-64
- [10] Smith GJ, Fan XH, Wang J, et al. Emergence and predominance of an H5N1 influenza variant in China. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(45): 16936-41
- [11] Chen H, Smith GJ, Li KS, et al. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(8): 2845-50
- [12] Lam TT, Hon CC, Pybus OG, et al. Evolutionary and transmission dynamics of reassortant H5N1 influenza virus in Indonesia. *PLoS Pathog*, 2008, 4(8): e1000130
- [13] Chutinimitkul S, Songserm T, Amonsin A, et al. New strain of influenza A virus (H5N1), Thailand. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(3): 506
- [14] Buchy P, Mardy S, Vong S, et al. Influenza A/H5N1 virus infection in humans in Cambodia. *J Clin Virol*, 2007, 39(3): 164-8
- [15] WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group. Toward a unified nomenclature system for highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(7): e1
- [16] Hu X, Liu D, Wang M, et al. Clade 2.3.2 avian influenza virus (H5N1), Qinghai Lake region, China, 2009-2010. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(3): 560
- [17] Chen HL. H5N1 avian influenza in China. *Sci Chn Series C: Life Sci*, 2009, 52(5): 419-27
- [18] Li KS, Guan Y, Wang J, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*, 2004, 430(6996): 209-13
- [19] Nguyen TD, Vijaykrishna D, Webster RG, et al. Multiple sublineages of influenza A virus (H5N1), Vietnam, 2005-2007. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(4): 632-6
- [20] Desvaux S, Sorn S, Holl D, et al. HPAI surveillance programme in Cambodia: results and perspectives. *Dev Biol*, 2005, 124: 211-24
- [21] Joannis T, Lombin LH, De Benedictis P, et al. Confirmation of H5N1 avian influenza in Africa. *Vet Rec*, 2006, 158(9): 309-10
- [22] Beigel JH, Farrar J, Han AM, et al. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med*, 2005, 353: 1374-85
- [23] Gambotto A, Barratt-Boyes SM, de Jong MD, et al. Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Lancet*, 2008, 371(9622): 1464-75
- [24] 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
- [25] Gu J, Xie Z, Gao Z, et al. H5N1 infection of the respiratory tract and beyond: a molecular pathology study. *Lancet*, 2007, 370(9593): 1137-45
- [26] van Riel D, den Bakker MA, Leijten LM, et al. Seasonal and pandemic human influenza viruses attach better to human upper respiratory tract epithelium than avian influenza viruses. *Am J Pathol*, 2010, 176(4): 1614-8
- [27] 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(4): 1215-23
- [28] de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med*, 2006, 12(10): 1203-7
- [29] Zhang Y, Sun Y, Sun H, et al. A single amino acid at the hemagglutinin cleavage site contributes to the pathogenicity and neurovirulence of H5N1 influenza virus in mice. *J Virol*, 2012, 86(12): 6924-31
- [30] Yen HL, Aldridge JR, Boon AC, et al. Changes in H5N1 influenza virus hemagglutinin receptor binding domain affect systemic spread. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(1): 286-91
- [31] Hatta M, Hatta Y, Kim JH, et al. Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice. *PLoS Pathog*, 2007, 3(10): e133
- [32] Gao Y, Zhang Y, Shinya K, et al. Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host. *PLoS Pathog*, 2009, 5(12): e1000709
- [33] Gabriel G, Herwig A, Klenk HD. Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin $\alpha 1$ is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog*, 2008, 4(2): e11
- [34] 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(9348): 1831-7
- [35] 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(1): 135
- [36] Sakabe S, Iwatsuki-Horimoto K, Takano R, et al. Cytokine production by primary human macrophages infected with highly pathogenic H5N1 or pandemic H1N1 2009 influenza viruses. *J Gen Virol*, 2011, 92(6): 1428-34
- [37] Herfst S, Schrauwen EJ, Linster M, et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science*, 2012, 336(6088): 1534-41
- [38] 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(7403): 420-8
- [39] Zhao G, Gu X, Lu X, et al. Novel reassortant highly pathogenic H5N2 avian influenza viruses in poultry in China. *PLoS One*, 2012, 7(9): e46183
- [40] Gu M, Liu W, Cao Y, et al. Novel reassortant highly pathogenic avian influenza (H5N5) viruses in domestic ducks, China. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(6): 1060-3
- [41] Zhao K, Gu M, Zhong L, et al. Characterization of three H5N5 and one H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in China. *Vet Microbiol*, 2013, 163(3): 351-7