

INFLUENZA AVIAR: ETIOLOGÍA, EPIDEMIOLOGÍA, VACUNAS Y RIESGO DE PANDEMIA

Avian Influenza: "Ethiology, Epidemiology, Vaccines and Risk of a Pandemia"

Carlos Jiménez Sánchez*

Pocas enfermedades han recibido tanta atención y han generado tanto temor en la población mundial como la Influenza Aviar de Alta Patogenicidad causada por un virus H5N1 que se presenta actualmente en algunos países de Asia, Europa y África. En esta charla pretendemos brindar algunos elementos claves sobre la etiología, epidemiología y prevención de esta enfermedad concentrándonos además, en la aplicación de vacunas. Finalmente abordaremos el riesgo que esta enfermedad de las aves conlleva para la población humana.

La Influenza Aviar de Alta Patogenicidad, conocida también como "Peste Aviar", es una enfermedad viral muy contagiosa que puede afectar aves de diversas especies domésticas como pollos, gallinas, pavos, patos, gansos, codornices, gallinas de Guinea y también especies silvestres (30). En poblaciones de aves domésticas esta enfermedad sistémica cursa con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad dañando los sistemas respiratorio, digestivo, nervioso y reproductivo (30), causando enormes pérdidas a la industria avícola.

El **agente causal** de la Influenza Aviar se clasifica dentro de la familia *Orthomyxoviridae*, género *Influenzavirus A*, posee un tamaño aproximado de 100nm, es pleomórfico, envuelto y su genoma es ARN, compuesto por 8 segmentos de hebra simple que codifican para 10 proteínas (16, 22, 30, 39). Las nucleocápsides poseen simetría helicoidal y en su superficie lipídica se distingue dos glicoproteínas denominadas Hemoaglutinina (H) y Neuraminidasa (N). En general los *Influenzavirus* son muy lábiles frente a las altas temperaturas y los desinfectantes (15, 20, 30). Los virus de Influenza Aviar presentan diferentes grados de patogenicidad que van desde infecciones subclínicas hasta cuadros letales (15, 30).

En los *Influenzavirus A* se ha logrado identificar 16 tipos diferentes de Hemoaglutinina, los cuales se

denotan con la letra H seguida por un número (H1-H16). Además, también se ha identificado 9 tipos distintos de Neuraminidasa que se denotan con la letra N y un número (N1-N9). Este sistema binario de nomenclatura explica porqué siempre que se habla de influenzavirus se les identifica con una combinación de letras y números (Ej. H1N1, H2N1, H5N1, H2N2, etc.) (15, 30).

La hemoaglutinina le permite a los virus influenza fijarse a receptores específicos en la membrana plasmática de células susceptibles, desempeña una actividad hemoaglutinante frente a eritrocitos de aves y es la responsable de generar el desarrollo de anticuerpos protectores (inhibidores de la hemoaglutinación y neutralizantes) en los individuos vacunados (30). Esta proteína además, representa el principal determinante de patogenicidad de los influenzavirus. Las hemoaglutininas de los tipos H1 hasta H16 se encuentran en virus de baja patogenicidad, mientras que los virus de alta patogenicidad poseen únicamente hemoaglutininas del tipo H5 o H7 (30). Sin embargo, no todas las proteínas H5 o H7 son de alta patogenicidad. Para poder infectar las células, los influenzavirus requieren no sólo que éstas posean los receptores específicos para su hemoaglutinina, sino que además, existan las proteasas adecuadas que recorten proteolíticamente la proteína H en dos subunidades: H1 y H2. La hemoaglutinina de los virus de baja patogenicidad puede ser recortada por proteasas del tipo tripsina, presente en el tracto respiratorio y digestivo, en tanto, que la hemoaglutinina de los virus de alta patogenicidad, esto es, algunos subtipos de H5 o H7, puede ser activada además, por proteasas del tipo furina (30). La amplia presencia de enzimas tipo furina en el organismo de las aves, explica por qué algunos subtipos de influenzavirus H5 o H7, producen enfermedad sistémica (30).

En general, la proteína N no está asociada a patogenicidad, y su principal papel consiste en favorecer la diseminación viral dentro del organismo (30).

* DVM, Dr.Med.Vet. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Costa Rica. E-mail: cajisa@medvet.una.ac.cr

La **epidemiología** de los *Influenzavirus A* involucra a especies aviarias acuáticas y a otras especies animales que incluyen aves (silvestres y domésticas) y mamíferos incluido el ser humano (22, 30, 39). En muchas aves acuáticas como patos, gansos o gaviotas, los *Influenzavirus* han permanecido durante largo tiempo, posiblemente cientos o miles de años, sin causar síntomas de enfermedad (39). Esto se explica por la evidencia de que muchas especies de aves acuáticas migratorias son portadoras inaparentes de *Influenzavirus* de baja patogenicidad (22, 30, 39).

De las aves acuáticas infectadas los virus pasan a otras aves silvestres susceptibles, mediante contacto directo o contaminación del agua y alimento con excretas, ampliando así el número de individuos y especies contaminados (22, 39). De igual forma, los *Influenzavirus* de baja patogenicidad pueden pasar a las aves domésticas, en las cuales, particularmente cepas con hemaglutinina H5 o H7, tras unos pocos pasajes, mutan y se transforman en virus de alta patogenicidad, que no solamente son muy contagiosos sino que además resultan letales y se propagan rápidamente entre las granjas mediante el movimiento de animales o de vehículos, vestimenta, calzado, alimento o utensilios contaminados (15, 22, 35, 39). Además, recientemente se ha demostrado, contrario a lo que se conocía anteriormente, que algunas cepas de *Influenzavirus* aviar de alta patogenicidad como la H5N1, pueden readaptarse a especies acuáticas silvestres, las cuales pueden enfermar y morir tras la infección o bien sobrevivir y transportar el virus hacia nuevas zonas geográficas siguiendo sus rutas migratorias (22) tal como se ha observado recientemente en Europa y África.

Los *Influenzavirus* de alta patogenicidad pueden conservar su viabilidad en el medio ambiente durante largos períodos de tiempo, en especial cuando las temperaturas son bajas. Se ha demostrado que la cepa H5N1 permanece viable en heces de aves por al menos 35 días si la temperatura es de 4°C. A una temperatura de 37°C la viabilidad se reduce a 6 días (40). Por el contrario, la presencia de desinfectantes como el Cloro conlleva rápidamente a la inactivación del virus (20).

Las manifestaciones clínicas de la influenza aviar de alta patogenicidad en aves domésticas varían con la especie, la edad de las aves y factores ambientales, pudiendo abarcar desde muerte súbita sin síntomas previos, hasta una enfermedad grave caracterizada por depresión, disnea, lacrimación, sinusitis, edema de cabeza, hemorragias subcutáneas, cianosis de cresta y barbillas y diarrea (15, 30). El diagnóstico confirmatorio requiere de apoyo laboratorial para aislar el virus en huevos embrionados, detectar sus proteínas estructurales o su genoma, o bien

establecer la presencia de anticuerpos específicos en la sangre de los animales afectados (15, 30, 43). Desde la perspectiva diagnóstica, conviene recordar que muchos "kits" comerciales para detección de antígeno poseen una eficacia muy reducida cuando se emplean a hisopados cloacales colectados en el campo y se comparan con el aislamiento viral en huevos embrionados (42).

Los países y regiones libres de influenza aviar de alta patogenicidad centran su **prevención** en la regulación de la importación de aves tanto domésticas como silvestres y de sus productos (15). Además se prepara y entrena a equipos de personal en el reconocimiento temprano de la enfermedad, y en el control y erradicación de la misma. Se realiza vigilancia epidemiológica activa y se obliga al reporte e investigación de los brotes de enfermedad respiratoria severa o aquellos que cursan con elevada morbilidad y mortalidad. A nivel de granja se fortalecen las medidas de bioseguridad con el propósito de aislar a las aves susceptibles de las fuentes de infección (28).

En aquellas regiones o países donde la enfermedad ya está presente resulta indispensable la detección temprana de la entrada del virus, lo cual previene el establecimiento de la enfermedad y que la misma se torne endémica, tal y como fue demostrado en los brotes de influenza aviar de alta patogenicidad de USA, Chile, Holanda, Japón, Corea del Sur y Malasia (24). En los países donde se retardó la detección temprana de casos, la enfermedad es endémica y lo ha sido por tres años o más, tal y como ha ocurrido en China, Vietnam e Indonesia (24, 28, 30). La detección precoz complementada con la contención y despoblación masiva reduce drásticamente el nivel de infección en las áreas infectadas (24, 28).

Después de la experiencia de México (28), la **vacunación** continuará siendo una de las medidas claves utilizadas en los países infectados endémicamente. La vacunación por sí sola no resultará en la eliminación de los *Influenzavirus* de alta patogenicidad de un país (23), pero si se usa correctamente, reducirá marcadamente la prevalencia y la susceptibilidad a la infección (24, 28). La vacunación ya ha jugado un papel valioso en la reducción de los efectos adversos de los virus H5N1 (6, 8, 12, 24, 28).

Una amplia variedad de **vacunas** para influenza aviar han sido desarrolladas y analizadas en los laboratorios para su potencial empleo en el campo (2, 5, 8, 15, 17, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 37). Sin embargo, son muy pocas las vacunas contra la cepa H5N1 que cuentan con licencia para ser utilizadas en avicultura (28). Por un lado, existen vacunas a virus inactivado en emulsión oleosa (laboratorios Intervet y Fort-Dodge) y por otro, dos vacunas recombinantes, una que emplea como

vector virus de viruela aviar (Merial) y otra, lanzada este año y registrada en México, que utiliza virus de Newcastle como vector (Avimex). En estas dos últimas, se ha insertado el gen de una Hemoaglutinina H5 dentro del genoma del vector. La vacuna inactivada oleosa y la vacuna con virus viruela como vector requieren de la manipulación e inyección de aves individuales, en tanto que la vacuna que emplea el Virus de la enfermedad de Newcastle permite la administración vía ocular y en el agua de bebida.

De acuerdo con la Oficina Internacional de Epizootias (OIE, denominada actualmente Organización Internacional de la Salud Animal) las vacunas recombinantes inducen buena inmunidad humoral y celular, pueden ser administradas a aves jóvenes en las que generan una protección temprana y permiten la diferenciación entre aves vacunadas e infectadas (1, 10, 15, 35, 43). Como inconveniente las vacunas recombinantes requieren que los animales carezcan de inmunidad activa contra el virus vector (vacunación o infección previa) y su eficacia puede ser afectada por los niveles de inmunidad materna (15). Además, algunos vectores como el virus de la Laringotraqueítis Infecciosa Aviar (ILT) no se replican en pavos con lo que se reduce el espectro de aplicación de estas vacunas (15). En cualquier caso conviene recordar que el monitoreo de la eficacia de la vacunación indica que si se obtienen títulos iguales o mayores de cuarenta en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA >1:40), las aves vacunadas estarán 100% protegidas de la enfermedad clínica y se obtendrá además, una drástica reducción en la diseminación viral (9).

INFLUENZA AVIAR Y SALUD PÚBLICA

Como se mencionó anteriormente, en la epidemiología de las infecciones por virus influenza, todos ellos provienen de aves silvestres acuáticas, las cuales representan el principal reservorio genético de estos virus. Una vez que los *Influenzavirus* se adaptan a una especie, tienden a ser altamente específicos de esa especie y muy raras veces infectan otras especies (30, 39, 40).

La influenza humana o gripe es una enfermedad propia de los seres humanos y es causada por subtipos de *Influenzavirus* que se adaptaron a la especie y se diseminan con facilidad entre los seres humanos. En la actualidad se sabe que los subtipos H1N1, H1N2, H3N2 son propios de la especie humana (39, 40).

Una **pandemia** de influenza (*del griego pan = todo, y demos = población*) es una gripe humana virulenta que causa un brote mundial, o pandémico, de enfermedad grave. Como hay poca inmunidad natural, la enfermedad puede propagarse fácilmente de persona a persona. En la actualidad, no hay gripe pandémica (4, 40).

A lo largo de la historia de la humanidad se han documentado diversas pandemias de influenza. El primer reporte data de 1889 y el agente causal fue un virus H2N2, posteriormente ocurrió otra pandemia en 1900 y el responsable fue un virus H3N8. La siguiente pandemia denominada gripe española aconteció en 1918 y fue causada por un virus H1N1 y se considera el episodio más devastador de influenza que causó la muerte de aproximadamente 50 millones de personas. Luego en 1957 se presentó la pandemia de gripe asiática causada por un virus H2N2. En 1968 se presenta la pandemia de influenza de Hong Kong y el responsable fue un virus H3N2 y posteriormente ocurre la pandemia de gripe rusa provocada por un virus H1N1 en el año 1968 (39, 41). Conviene resaltar aquí que en todos los casos documentados las pandemias humanas de influenza han sido causadas por *influenzavirus* H1, H2 o H3 (14, 16, 39).

Desde 1959 se ha constatado esporádicamente la infección de seres humanos con cepas de *influenzavirus* aviarios del tipo H7N3, H7N7, H9N2, H7N2 y H5N1. En general estas infecciones han resultado en una enfermedad leve o moderada con excepción del virus H5N1 (40). El virus H5N1 ha generado una gran preocupación por el número de casos en humanos y la elevada mortalidad que provoca. En 1997 18 personas de Hong Kong se infectaron y 6 fallecieron. El evento se repitió en el año 2003 otra vez en Hong Kong, enfermaron dos personas y una falleció. Desde diciembre del 2003 al 10 de setiembre del presente año, se han reportado en diversos países de Asia y África, 328 personas enfermas con H5N1 de las cuales 200 han fallecido (40).

Si el virus de Influenza Aviar H5N1 puede ser la causa de una pandemia o no, ha generado una gran polémica no sólo en la opinión pública sino también en los medios científicos (3, 4, 14, 16, 19, 22). Para generar una pandemia se requiere que el virus H5N1 se replique masivamente en las personas infectadas y que además, se transmita fácilmente a otros individuos (22). Sin embargo, la evidencia disponible indica que la replicación en seres humanos solo tiene lugar en los neumocitos tipo II, ubicados en los alveolos pulmonares y en algunas células del epitelio intestinal (36). Además, estudios de campo han revelado que la transmisión del virus de personas enfermas a sanas no ocurre (4, 40). Los casos que se han presentado se atribuyen al contacto directo de las personas con aves enfermas y/o sus excretas (4, 40), siendo el grupo de los niños y las personas jóvenes, el mayormente afectado (25, 41). Finalmente la investigación de los casos ocurridos en personas indica que la transmisión del virus H5N1 desde las aves infectadas a seres humanos es muy limitada (38).

Desde la perspectiva virológica se han planteado varias explicaciones. Por un lado, los antecedentes históricos demuestran que las pandemias de influenza humana han sido causadas por *Influenzavirus A* con hemagglutininas H1, H2 y H3; nunca por virus con hemagglutininas H5 o H7 (14, 16). Por otro lado, el estudio detallado de la estructura molecular y conformacional de las hemoagglutininas indica que las hemoagglutininas H5 no encajan con los receptores humanos de virus influenza (7). A esto se agrega el hallazgo de que los Influenzavirus aviáres y los humanos poseen tropismos celulares diferentes y utilizan receptores diferentes (13). Si bien es cierto los mecanismos de mutación e intercambio genético que caracteriza a los virus influenza podrían facilitar la evolución y posterior adaptación exitosa de la cepa H5N1 a la especie humana (11, 22, 39), el tiempo transcurrido desde la aparición de esta cepa, para algunos autores desde mediados de los años 80 (16) y seroprevalencias hasta de un 7% en la población de China, indican que esa opción es muy poco probable (3, 14, 16).

Como corolario se debe señalar que resulta imposible predecir cuándo ocurrirá la próxima pandemia de influenza y si la cepa H5N1 será la responsable. Sin embargo, la potencial amenaza que para la humanidad representa este y otros agentes infecciosos debe convertirse en una excelente oportunidad de solidaridad internacional que permita mejorar los servicios de salud, especialmente en los países en vías de desarrollo y para brindar las condiciones mínimas de agua potable, higiene, nutrición, inmunización y educación a las poblaciones (21). Algunos pasos ya se han dado con el desarrollo de prometedoras vacunas y sustancias antivirales para uso humano (16, 27, 34, 39) así como en el desarrollo de protocolos adecuados de tratamiento (18). En nuestras manos está, transformar la visión apocalíptica que prevalece sobre la cepa H5N1 en un mejor futuro para nuestros pueblos.

REFERENCIAS

1. Beato, M.S., Michela Rigoni, Adelaide Milani, and Ilaria Capua. (2007). Generation of Avian Influenza Reassortant Viruses of the H7N5 Subtype as Potential Vaccine Candidates to Be Used in the Framework of a "DIVA" Vaccination Strategy. *Avian Diseases*: Vol. 51, No. s1, pp. 479-480.
2. Bublot, M., Pritchard, Julio S. Cruz, Thomas R. Mickle, Paul Selleck, and David E. Swayne (2007). Efficacy of a Fowlpox-Vectored Avian Influenza H5 Vaccine Against Asian H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Challenge. *Avian Diseases*: Vol. 51, No. s1, pp. 498-500.
3. Butler, D. (2006). Yes, but will it jump? *Nature* 439(12):124-125.
4. CDC: <http://www.pandemicflu.gov/>
5. Ge J, Deng G, Wen Z, Tian G, Wang Y, Shi J, Wang X, Li Y, Hu S, Jiang Y, Yang C, Yu K, Bu Z, Chen H. (2007). Newcastle disease virus-based live attenuated vaccine completely protects chickens and mice from lethal challenge of homologous and heterologous H5N1 avian influenza viruses. *Journal of Virology* 81(1):150-8.
6. Capua, I., and Marangon, S. (2007). The Challenge of Controlling Notifiable Avian Influenza by Means of Vaccination. *Avian Diseases*: Vol. 51, No. s1, pp. 317-322.
7. Ha, Y., Stevens, D.J., Skehel, J.J., and Willey, D.C. (2001). X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 1181-1186.
8. Intervet (2006). Effect of vaccination on virus excretion and transmission. Summary of data on Intervet vaccines against Highly Pathogenic Avian Influenza. http://www.avian-influenza.com/Control/intervet_influenza_vaccines.asp; http://www.avian-influenza.com/binaries/95_108458.pdf
9. Kumar, M., Hsien-Jue Chu, Jeff Rodenberg, Scott Krauss, and Robert G. Webster (2006). Association of Serologic and Protective Responses of Avian Influenza Vaccines in Chickens. *Avian Diseases*: Vol. 51, No. s1, pp. 481-483.
10. Lambrecht, B., M. Steensels, S. Van Borm, G. Meulemans, and T. van den Berg (2007). Development of an M2e-Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Differentiating Infected from Vaccinated Animals. *Avian Diseases*: Vol. 51, No. s1, pp. 221-226.

11. Lin, Y.P., M. Shaw, V. Gregory, K. Cameron, W. Lim, A. Klimov, K. Subbarao, Y. Guan, S. Krauss, K. Shorridge, R. Webster, N. Cox, and A. Hay. (2000). Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: Relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(17): 9654-9658.
12. Marangon, S., Busani, L., and Capua, I. (2007). Practicalities of the Implementation of a Vaccination Campaign for Avian Influenza. *Avian Diseases: Vol. 51, No. s1, pp. 297-303.*
13. Matrosovich, M.N., Tatyana Y. Matrosovich, Thomas Gray, Noel A. Roberts, and Hans-Dieter Klenk (2004). Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(13):4620-4624.
14. Normile, D. (2005). Pandemic Skeptics Warn Against Crying Wolf. *Science* 310: 1112-1113.
15. Office International des Epizooties (OIE) (2005). Chapter 2.7.12. Avian Influenza. In: *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* OIE, Paris, France.
16. Palese, P. (2004). Influenza: old and new threats. *Nature Medicine* 10(12):S82-S87.
17. Park, MS, Steel J, García-Sastre A, Swayne D, Palese P (2006). Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: avian influenza and Newcastle disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(21):8203-8.
18. Pearson, H. (2006). Controlling immune response may cut bird flu death rate. *Nature Medicine.* Published online: 29 September 2006; | doi:10.1038/nm1006-1105.
19. Perdue, M.L., and Swayne, D.E. (2005). Public Health Risk from Avian Influenza Viruses. *Avian Diseases: Vol. 49, No. 3, pp. 317-327.*
20. Rice EW, Adcock NJ, Sivaganesan M, Brown JD, Stallknecht DE, Swayne DE. (2007). Chlorine inactivation of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerging Infectious Diseases.* Oct; [Epub ahead of print]
21. Pittet, D. (2005). Clean hands reduce the burden of disease. *The Lancet* 366: 185-187.
22. Russel, C. Webster, R.G. (2005). The Genesis of a Pandemic Influenza Virus. *Cell* 10.019: 368-371.
23. Savill, N.J. St. Rose, S.G., Keeling, M.J., Woolhouse, M.E.J. (2006). Silent spread of H5N1 in vaccinated poultry. *Nature*, 442: 757.
24. Sims, L.D. (2007). Lessons Learned from Asian H5N1 Outbreak Control. *Avian Diseases: Vol. 51, No. s1, pp. 174-181.*
25. Smallman-Raynor, M., and Cliff, A.D. (2007). Avian Influenza A (H5N1) Age Distribution in Humans. *Emerging Infectious Diseases* 13: 510-512.
26. Steensels, M., S. Van Borm, B. Lambrecht, J. De Vriese, F.-X. Le Gros, M. Bublot, and T. van den Berg Efficacy of an Inactivated and a Fowlpox-Vectored Vaccine in Muscovy Ducks Against an Asian H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viral Challenge. *Avian Diseases: Vol. 51, No. s1, pp. 325-331.*
27. Suguitan AL Jr., McAuliffe J, Mills KL, Jin H, Duke G, et al. (2006). Live, attenuated influenza A H5N1 candidate vaccines provide broad cross-protection in mice and ferrets. *PLoS Med* 3(9): e360. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030360.
28. Swayne, D.E. (2005). AVIAN INFLUENZA, POULTRY VACCINES: A REVIEW. A ProMED-mail post Mon 7 Mar 2005.
29. Swayne DE, Beck JR, Mickle TR (1997). Efficacy of recombinant fowl poxvirus vaccine in protecting chickens against a highly pathogenic Mexican-origin H5N2 avian influenza virus. *Avian Dis.* 1997 Oct-Dec;41(4):910-22.
30. Swayne, D.E., Halvorson, D.A., 2003. Influenza. In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Swayne, D.E. (Eds.), *Diseases of Poultry*, 11th ed. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 135-160.
31. Swayne, D.E., Perdue, M.L., Beck, J.R., Garcia, M., Suarez, D.L., 2000b. Vaccines protect chickens against H5 highly pathogenic avian influenza in the face of genetic changes in field viruses over multiple years. *Vet. Microbiol.* 74 (1/2): 165-172.
32. Swayne DE, Suarez DL, Schultz-Cherry S, Tumpey TM, King DJ, Nakaya T, Palese P, Garcia-Sastre A. (2003). Recombinant paramyxovirus type 1-avian influenza-H7 virus as a vaccine for protection of chickens against influenza and Newcastle disease. *Avian Diseases* 47(3 Suppl):1047-50.
33. Terregino, C., A. Toffan, M. S. Beato, R. De Nardi, A. Drago, and I. Capua. (2007). Conventional H5N9 Vaccine Suppresses Shedding in Specific-Pathogen-Free Birds Challenged with HPAI H5N1 A/Chicken/Yamaguchi/7/2004. *Avian Diseases: Vol. 51, No. s1, pp. 495-497.*

34. Treanor, J.J., Campbell, J.D., Zangwill, K.M., Thomas, M.D., Rowe, M.S. and Wolff, M. (2006). Safety and Immunogenicity of an Inactivated Subvirion Influenza A (H5N1) Vaccine. *New England Journal of Medicine* 354 (134): 1343-1351.
35. Tumpey, T.M., Alvarez, R., Swayne, D.E., Suarez, D.L., 2005. A diagnostic aid for differentiating infected from vaccinated poultry based on antibodies to the nonstructural (NS1) protein of influenza A virus. *J.Clin. Microbiol.* 43 (2): 676-683.
36. Uiprasertkul, M., Pilaipan Puthavathana, Kantima Sangsiriwut, Phisanu Pooruk, Kanittar Srisook, Malik Peiris, John M. Nicholls, Kulkanya Chokephaibulkit, Nirun Vanprapar, and Prasert Auewarakul (2005). Influenza A H5N1 Replication Sites in Humans. *Emerging Infectious Diseases* 11(7): 1036-1041.
37. Veits J, Wiesner D, Fuchs W, Hoffmann B, Granzow H, Starick E, Mundt E, Schirrmeier H, Mebatsion T, Mettenleiter TC, Römer-Oberdörfer A. (2006). Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3;103(21):8197-202.
38. Vong, S. Benjamin Coghlan, Sek Mardy, Davun Holl, Heng Seng, Sovann Ly, Megge J. Miller, Philippe Buchy, Yves Froehlich, Jean Baptiste Dufourcq, Timothy M. Uyeki, Wilina Lim, and Touch Sok (2006). Low Frequency of Poultry-to-Human H5N1 Virus Transmission in Southern Cambodia, 2005. *Emerging Infectious Diseases* 12 (10): 1542-1547.
39. Webster, R. (1998). Influenza A: An Emerging Disease. *Emerging Infectious Diseases* 4(3):436-441.
40. WHO: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/avianinfluenza_factsheetJan2006/en/index.html
41. WHO (2006). Epidemiology of WHO-confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) infection. *Weekly epidemiological record* 81: 249-260.
- 42 Woolcock, P.R., and Cardona, C.J. (2006). Commercial Immunoassay Kits for the Detection of Influenza Virus Type A: Evaluation of Their Use with Poultry. *Avian Diseases: Vol. 49, No. 4, pp. 477-481.*
43. Zhang, A., Meilin Jin, Fangfang Liu, Xuebo Guo, Qiaoyun Hu, Li Han, Yadi Tan and Huanchun Chen (2006). Development and Evaluation of a DAS-ELISA for Rapid Detection of Avian Influenza Viruses. *Avian Diseases: Vol. 50, No. 3, pp. 325-330.*