

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Daniel Divín**

**Evoluce hostitelské specifity ptačí chřipky**  
**Evolution of host specificity in avian influenza**

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Michal Vinkler, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Hana Velová

Praha, 2018

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně s použitím uvedených zdrojů.

V Praze dne 6. května 2018

Daniel Divín

### **Poděkování**

Rád bych poděkoval svému školiteli Michalu Vinklerovi za pomoc a cenné rady při psaní bakalářské práce. Dále bych také poděkoval rodině a přítelkyni za podporu a pomoc s formální a jazykovou úpravou práce.

## **Abstrakt**

Ptačí chřipka je nebezpečné virové onemocnění, které ohrožuje zdraví zvířat i lidí a v současné době často vyvolává velké obavy související s hrozbou pandemie. Veterinární postupy v rámci limitace šíření infekce zahrnují usmrcení veškerého ptactva v okolí vypuknutí nákazy, čímž se snaží co nejvíce omezit hospodářské škody. Přitom je ale patrná značná variabilita v náchylnosti, průběhu a přenosu tohoto onemocnění u různých druhů. U modelových druhů (*Anas platyrhynchos f. domestica* a *Gallus gallus f. domestica*) můžeme pozorovat velký rozdíl v průběhu onemocnění související s rozdílnou výbavou imunitních genů. Informace o této variabilitě u ostatních druhů jsou neucelené a jejich množství je nedostačující. Hlavním cílem práce je proto shrnout poznatky o ptačí chřipce, o jejím vzniku, evoluci, diverzitě, šíření v přírodě a náchylnosti jednotlivých druhů k tomuto onemocnění.

**Klíčová slova:** imunologie, ptačí imunologie, chřipka, ptačí chřipka, virologie, disease ecology

## **Abstract**

Avian influenza is a dangerous viral disease, which threatens animals and people's health and nowadays evokes great concerns linked with pandemic threat. Veterinary procedures tries to limit spreading of infection by eradication of all birds nearby the outbreak place of the disease to limit as much economic damage as possible. However, there is obvious considerable variability in susceptibility, course and transmission of the disease in different species. In model species (*Anas platyrhynchos f. domestica* a *Gallus gallus f. domestica*), we can see a big difference in course of the disease linked with different equipment of immunity genes. There is fragmented information about other species. The main aim is therefore to summarize knowledge about avian influenza, it's origin, evolution, diversity, spreading in environment and susceptibility of different species to this disease.

**Keywords:** immunology, avian immunology, influenza, avian influenza, virology, disease ecology

# Obsah

Použité zkratky.....	v
Úvod .....	1
1. Ekologické a evoluční faktory ovlivňující hostitelskou specifitu .....	2
2. Ptačí chřipka.....	3
2.1. Popis viru a jeho životního cyklu .....	3
2.2. Variabilita a rozlišování různých typů chřipky .....	5
2.3. Evoluce chřipky .....	6
2.4. Původ vysoce patogenní ptačí chřipky .....	8
3. Diverzita v imunitní odpovědi na chřipkovou infekci .....	9
3.1. Interakce s hostitelem – rozpoznání viru a zahájení imunitní odpovědi .....	9
3.2. Obecná imunitní odpověď a příznaky při chřipkové infekci .....	13
3.3. Imunitní odpověď a příznaky při infekci HPAI u savců a člověka.....	15
3.4. Imunitní odpověď a příznaky při infekci HPAI u ptáků .....	16
3.5. Imunopatologie způsobené nákazou HPAI.....	17
4. Šíření ptačí chřipky mezi různými druhy .....	18
4.1. Ptáci .....	18
4.2. Savci .....	20
4.3. Chřipka u ektotermních druhů .....	24
5. Ochranná opatření související s ptačí chřipkou.....	24
5.1. Léčba a prevence .....	24
5.2. Legislativa .....	26
6. Závěr .....	28
7. Použitá literatura .....	29

## Použité zkratky

AK	aminokyselina
AP-1	aktivátorový protein 1
ARDS	syndrom akutní dechové tísně (acute respiratory distress syndrome)
CpG ODN	cytosin fosfodiester guanin oligodeoxynukleotid
DC	dendritické buňky (dendritic cells)
dsRNA	dvojitězřezová ribonukleová kyselina (double-stranded RNA)
EU	Evropská unie
HA	hemaglutinin
H5N1	vysoce patogenní ptačí chřipka (high pathogenity avian influenza)
IFITM	IFN-induced transmembrane protein
IFN	interferon
IFNs	interferony
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IRAK	IL-1 receptor asociované kinázy (IL-1 receptor associated kinase)
IRF	interferon regulující faktor
ISG	IFN-stimulovaný gen
JAK	JAK kináza (Janus kinase)
LPAI	málo patogenní ptačí chřipka (low pathogenity avian influenza)
LPS	lipopolysacharid
M2	matrixový protein 2
MCP	monocyte chemotactic protein
MDA-5	melanoma differetiation associated gene-5
MIP	macrophage inflammatory protein
Mx	myxovirus resistantní gen
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NA	neuraminidáza
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NK	přirozený zabíječ (natural killer)
NO	oxid dusnatý
OAS	2',5'-oligoadenylátsyntetáza
pDC	plasmatické dendritické buňky
PKR	RNA-dependentní protein kináza
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RIG-I	retinoic acid inducible gene I
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
ssRNA	jednořetězcová ribonukleová kyselina
STAT	signal transducer and activator of transcription
SVS	státní veterinární správa
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis faktor
TRAF	TNF-receptor asociovaný faktor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

## Úvod

Ptačí chřipka je virové onemocnění endotermních obratlovců, které v dnešní době vyvolává velké obavy především v souvislosti s ohrožením zdraví zvířat i lidí a se vznikem značných hospodářských škod. Kromě ptáků mohou některé typy tohoto viru sporadicky napadat i různé druhy savců včetně člověka a způsobit vážný průběh onemocnění, které může vyústit až ve smrt (Reperant 2009; Beigel et al. 2005). V zemědělství způsobuje ptačí chřipka velké ztráty drůbeže a v případě lokálního výskytu vyžadují veterinární směrnice eradikaci veškerého potenciálně infikovaného domácího ptactva k zabránění šíření viru. Přitom se zdá, že jsou různé druhy k této infekci jinak citlivé. Mimo zdravotní a hospodářské hledisko je proto také zajímavá otázka, zda existuje nějaký evoluční důvod, proč jsou různé druhy k této infekci různě vnímavé, jaká je imunitní odpověď u různých druhů, jestli se nějak liší u divokých a domestikovaných druhů a zda to nějak ovlivňuje šíření viru v prostředí. Proto se v této práci hodně věnuji evoluci viru, diverzitě v imunitních procesech a vážnosti klinických a patologických příznaků u různých druhů a také rozdílům ve schopnosti virus dále šířit s cílem nalézt, jestli mezi těmito jevy existuje spojitost. Většina současných prací je zaměřena na rozdíly pouze mezi dvěma druhy – kurem domácím (*Gallus gallus f. domestica*) a kachnou domácí (*Anas platyrhynchos f. domestica*), které jsou podrobně zkoumány především pro jejich hospodářský význam. Pro lepší pochopení šíření této nákazy v přírodě, by bylo potřeba zaměřit výzkum na širší škálu hostitelů, alespoň těch nejběžnějších druhů ptáků, kteří přicházejí do styku s domácími ptáky, savci a člověkem. Shrnuté poznatky týkající se imunologických rozdílů v průběhu onemocnění mezi kachnou domácí a kurem domácím mohou být do jisté míry přenositelné i na průběh onemocnění ptačí chřipkou u některých jiných ptačích druhů. S ohledem na velkou mezidruhovou variabilitu imunity je ovšem potřeba klást důraz na výzkum rezistence širšího spektra druhů. Hlavním cílem této práce je proto poukázat na velkou diverzitu chřipkových virů, na odlišnou náchylnost různých hostitelů a nastínit směr dalšího výzkumu, který by vedl k pochopení ekologických a evolučních aspektů ovlivňujících imunologickou a fyziologickou variabilitu jeho hostitelů a tím vedl k přesnějšímu zacílení některých veterinárních postupů a případně také návrhu opatření směřujících k omezení šíření chřipkové infekce v populacích zvířat i lidí.

## 1. Ekologické a evoluční faktory ovlivňující hostitelskou specifitu

Parazité, tedy organismy, které tráví určitou část svého života asociovanou se svým hostitelem, přičemž mají z tohoto vztahu užitek a hostitel škodu, se v rámci evolučního zápasu se svými hostiteli snaží co nejlépe se přizpůsobit svým hostitelům a daným ekologickým podmínkám ovlivňujícím přenos infekce. Tím si utvářejí tzv. evolučně stabilní strategie (Schmid-Hempel 2011). Jedním z aspektů této strategie je hostitelská specifita, tedy druhový rozsah hostitelů, které daný parazit napadá. Z tohoto pohledu rozdělujeme parazity na specialisty, kteří napadají úzké rozmezí hostitelů, a generalisty, kteří dokáží infikovat širokou škálu hostitelů. Parazité s úzkým rozsahem hostitelů jsou na svém hostitelském druhu mnohem více existenčně závislí než ti s širokým rozsahem, což ovlivňuje například i možnost eradikace nemocí. Hostitelský rozsah je dán ekologickým filtrem (pravděpodobnost setkání s jiným hostitelem) a fyziologickým filtrem (šance, že se parazit v novém hostiteli úspěšně uchytí) (Schmid-Hempel 2011; Weber and Stilianakis 2007). Paraziti s širokým rozsahem hostitelů, kteří mají možnost se s jiným hostitelem setkat, jsou schopni přenosu a adaptace na nového hostitele, což může vést k vytvoření nových typů a diverzitě parazitů. Pokud se danému parazitovi podaří se uchytit u hostitelů, kteří na něj zatím nejsou adaptováni, může docházet k neadekvátní imunitní odpovědi hostitele, která může být moc slabá, nebo naopak moc silná a vést tak k imunopatologiím, kdy míra působení imunitního systému je natolik vysoká, že prudce přesáhne hladinu virulence parazita (tedy míru patogenity), čímž silně ovlivňuje životaschopnost nejen parazita, ale i hostitele. Existují dva základní typy imunopatologií – jednak remodelace tkání a jednak cytotoxicita, tedy zabíjení parazitických i tělu vlastních (infikovaných) buněk, přičemž u mikroparazitů jako jsou viry, funguje spíše cytotoxický typ (Graham, Allen, and Read 2005). Při infekci tedy kromě kontroly nad množením parazita v těle dochází také k poškozování vlastních tkání. Jedním z několika evolučních vysvětlení imunopatologií je právě kontakt s novým parazitem, kdy ještě nestihla proběhnout selekce na optimalizaci imunitní odpovědi. Mezi další teorie výskytu imunopatologií patří omezená schopnost imunitního systému dosáhnout správného optima, setkání s patogenem v pozdějších stádiích života nebo to, že imunopatologie selektují genotyp parazitů a mohou tak mít pozitivní účinky na jejich přenos. Míra parazitismu a hodnota imunitní odpovědi je závislá i na ekologických faktorech. Například v případě virů chřipky je přirozené prostředí pro šíření virových částic voda a přirozenými hostiteli chřipky jsou tedy vodní ptáci (Olsen et al. 2006). Změny, vyvolané také například zásahem člověka do prostředí, mohou způsobit šíření parazitů do nových

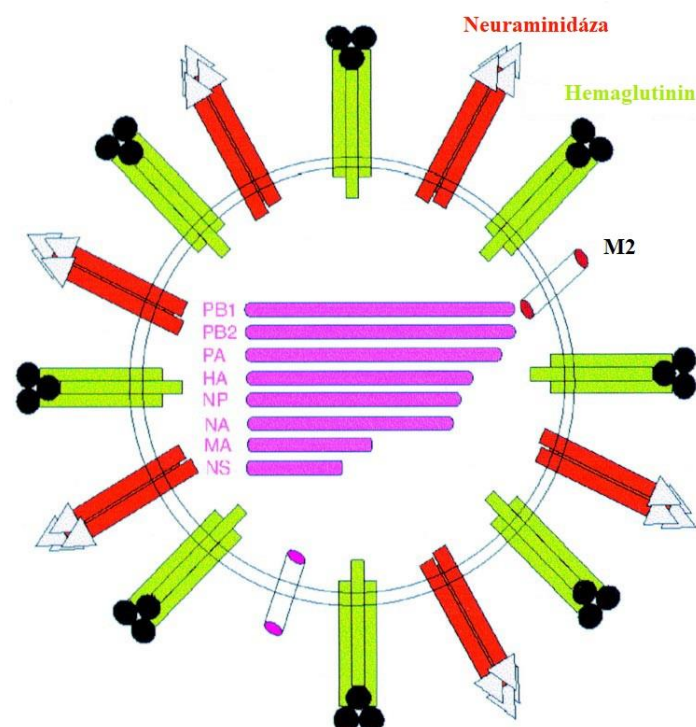
míst, mezi hostitele, kteří dosud nebyli takovým parazitům vystaveni a vyvolat tak rapidní šíření nemocí (Penczykowski, Laine, and Koskella 2016). Parazité generalisti se často lépe adaptují na novou populaci hostitelů, než specialisti. Ptačí chřipka je jako generalistický parazit schopna dobře napadat nové hostitele, adaptovat se na ně, a tedy vytvářet nové typy vedoucí k velké diverzitě tohoto viru.

## **2. Ptačí chřipka**

### **2.1. Popis viru a jeho životního cyklu**

Všechny chřipkové viry patří do čeledi Orthomixoviridae (z řeckého „myxos“, neboli hlen, tedy viry izolované z hlenu) a dělí se na tři typy: A, B a C, přičemž nejvýznamnější je typ A, jehož rezervoárem je divoké, migrující, vodní ptactvo, odkud se šíří mezi ostatní ptáky i savce (včetně člověka), mezi kterými se pak šíří dál (Maines et al. 2008). Ze všech tří typů napadá právě chřipka typu A nejširší škálu hostitelů a způsobuje tedy nejvíce chřipkových zdravotních potíží u zvířecích i lidských populací. Chřipky typu B a C jsou epidemiologicky méně závažné a vyskytují se u člověka a několika málo druhů savců (Suarez and Schultz-Cherry 2000; Maines et al. 2008). Chřipka typu B způsobuje mírná sezónní nachlazení a může způsobit lokální epidemie. Kromě člověka byla detekována například u tuleňů (Osterhaus et al. 2000). Chřipka typu C je nejméně závažná. Vyskytuje se u malých dětí, prasat a psů a epidemie nevyvolává (Calvo et al. 2013; Osterhaus et al. 2000). U ptáků se vyskytují pouze chřipkové viry typu A, proto je v této práci chřipkou myšlena chřipka typu A, pokud není uvedeno jinak. Virion chřipky je velký 80 až 120 nm, kulovitěho tvaru a s obalem, ve kterém nalezneme dva důležité glykoproteinové antigeny a to hemaglutinin a neuraminidázu (Vajda et al. 2016). Hemaglutinin (HA) je glykosylovaný, integrální, membránový protein s vazebným místem, sloužící viru k přichycení na kyselinu sialovou, která zakončuje glykoproteinový receptor hostitelských buněk. Je to homotrimer, a mezi jeho dvěma podjednotkami HA1-HA2 se nachází tzv. štěpné místo. Neuraminidáza (NA) jednak rozrušuje hlen na povrchu epitelu dýchacích cest a zároveň odštěpuje kyselinu sialovou z receptoru. HA a NA jsou tedy důležité pro vstup viru do buňky a NA i pro jeho uvolnění z infikované buňky. Tyto dva proteiny se vyskytují v několika typech. V současné době známe 16 typů HA a 9 typů NA (Maines et al. 2008). Existují ještě tzv. H17N10 a H18N11 „influenza-like“ viry izolované z netopýrů, které se ale mezi běžné chřipkové viry neřadí (Wu et al. 2014). Dohromady tedy máme 144 kombinací, díky kterým rozlišujeme kmeny (lépe řečeno subtypy) chřipky typu A (např. subtyp H5N1 obsahuje HA typu 5 a NA typu 1). Každý subtyp má specifitu pro daného hostitele, či

okruh hostitelů, ovšem u ptáků nalezneme viry se všemi typy HA i NA. Genom viru je segmentovaný. Skládá se z osmi segmentů anti-sense jednořetězcové RNA (-ssRNA) ve formě nukleoproteinů, které kódují 14 proteinů (Wu et al. 2014). Jsou to geny *PB1*, *PB2*, *PA*, *HA*, *NP*, *NA*, *MA* a *NS*. Tyto geny můžeme rozdělit na ty, které kódují povrchové proteiny, například *HA*, *NA* a *M2* (matrixový protein 2). Tyto proteiny jsou nezbytné pro životní cyklus viru, zároveň jsou spouštěči protilátkové odpovědi hostitele. Dále vnitřní proteiny, například polymerázy *PA*, *PB1* a *PB2*, nukleokapsidový protein (*NP*), matrixový protein 1 (*M1*) a geny pro nestrukturní proteiny *NS1* a *NS2*. Později byly popsány ještě další čtyři proteiny *PB1-F2*, *PB1 N40*, *PA-X* a *M42* (X. Liu, Zhao, and Liu 2013). *M2* protein je dalším membránovým proteinem, funguje jako iontový kanál pro  $H^+$  a je nezbytný pro životní cyklus. Virus vstupuje do buňky endocytickou cestou (Hamilton, Whittaker, and Daniel 2012). Endocytóza proběhne po přichycení viru na receptor na povrchu buňky pomocí podjednotky hemagglutininu *HA1*, která obsahuje vazebnou doménu pro kyselinu sialovou. V endosomech dochází ke snižování pH a štěpení *HA* na dvě podjednotky pomocí hostitelských proteáz, což je nezbytný krok v životním cyklu viru. Po uvolnění *HA1* podjednotky totiž *HA2* podjednotka umožní fúzi membrán obalu viru a endosomu. Dále *M2* iontový kanál čerpá ionty  $H^+$  i dovnitř viru. Snižující se pH způsobí konformační změny virové kapsidy a uvolnění virových nukleoproteinů do cytoplasmy. Zde si virová RNA naváže hostitelskou 5'čepičku tvořenou 7-



Obrázek 1 - Struktura viru ptačí chřipky (převzato a upraveno dle Suarez and Schultz-Cherry, 2000)

methylguanositrifosfátem, která umožní transport do jádra, kde probíhá replikace virovými polymerázami a transkripce. Virová mRNA je přenesena do cytoplazmy, kde probíhá translace strukturálních a membránových proteinů a proteinů, které se vrací do jádra pro zmnoženou virovou RNA a přenáší ji do cytoplazmy, aby mohlo dojít k sestavení nových virionů. Sestavený virus (zatím bez obalu) putuje k cytoplazmatické membráně, ve které už na něj čekají membránové proteiny HA, NA a M2. Tento úsek membrány hostitelské buňky si virus odnáší sebou (Maines et al. 2008). Pro únik viru z povrchu buňky je nezbytná NA, která odštěpuje kyselinu sialovou z buněčných receptorů (Suarez and Schultz-Cherry 2000).

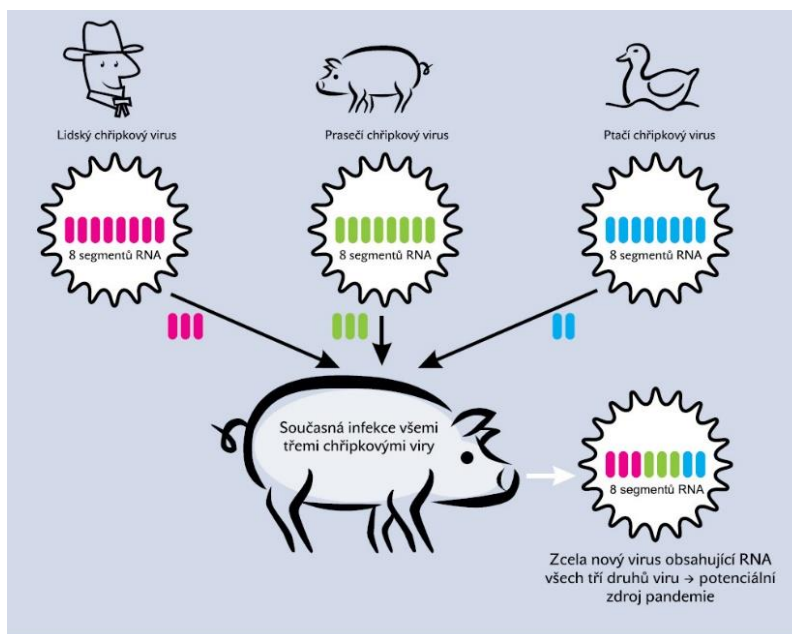
## **2.2. Variabilita a rozlišování různých typů chřipky**

Jak již bylo řečeno, používáme u chřipkových virů nomenklaturu podle přítomného typu HA a NA, čímž se chřipka dělí na tzv. subtypy (kmeny). Různým subtypům chřipky se dále podle revize WHO dává při izolaci mezinárodní označení, ve kterém se nachází informace, o jaký typ chřipky se jedná, o druhu z něhož byl virus izolován (neudává se, pokud byl izolován z člověka), na jakém místě byl izolován, dále je obsaženo sériové číslo izolátu, které definuje jeden kmen z několika izolovaných na stejném místě (číslo může být pro každý virus izolovaný na jednom místě použito pouze jednou) a v jakém roce byl virus izolován. Obecné označení je tedy typ/druh/místo/číslo izolátu/rok. Takže například H5N1 A/duck/Šanghaj/38/2001 je kmen H5N1 chřipky typu A izolovaný z kachny v Šanghaji v roce 2001 se sériovým číslem izolátu 38 (WHO 1980; WHO and Expert Committee on Influenza 1953). Dále můžeme rozdělovat chřipku podle toho, jakého napadá hostitele a mezi jakými druhy se šíří. Existují kmeny běžně cirkulující mezi ptáky, typicky třeba kmeny H7 či H9, pak je nazýváme ptačí chřipkou. Dále máme kmeny napadající člověka, typicky H1, H2, H3, specificky to jsou kmeny způsobující běžné sezónní nachlazení H1N1, H2N2 a H3N2 (Maines et al. 2008; Wu et al. 2014). Z médií známe ještě označení prasečí chřipka, vyskytující se u prasat. Další druhy, které chřipka běžně napadá, jsou například vodní savci (tuleni, velryby), šelmy (fretky) či koně. V literatuře se za primární zdroj všech chřipkových typů hemagglutininů a neuraminidázy běžně udávají ptáci. Přesněji vodní, migrující ptáci jako racci, bahňáci a vrubozobí, u nichž nalezneme všechny kombinace subtypů chřipkových virů. Fungují tedy jako přirozený rezervoár, z kterého se chřipkové kmeny mohou šířit mezi jiné druhy a z tohoto pohledu se tedy o každé chřipce může uvažovat jako o ptačí. Pokud se virus chřipky nějakého subtypu dokáže přenést a adaptovat na svého nového hostitele tak, že dochází k přenosu z jedince na jedince v rámci druhu, začne se chřipkový virus nazývat podle svého nynějšího hostitele. I u nového hostitelského druhu může probíhat evoluce a vznik no-

vých forem viru a jejich přenos na další hostitelský druh. Přesná definice ptačí chřipky je proto problematická. Existují kmeny napadající výhradně jen ptáky, způsobující mírné, či středně vážné příznaky onemocnění. Takovou ptačí chřipku označujeme jako málo patogenní ptačí chřipku (Low Patogenity Avian Influenza, LPAI) (Maines et al. 2008). Z LPAI se pravděpodobně vyvinula vysoce patogenní ptačí chřipka (High Patogenity Avian Influenza, HPAI), která způsobuje velmi vážné příznaky onemocnění a může se šířit i na savce. Takovým typickým a známým představitelem HPAI je kmen H5N1. Rozdíl mezi HPAI a LPAI je v míře virulence. Rozhoduje o tom nezbytný krok pro životní cyklus viru a to štěpení hemaglutininu (Hamilton, Whittaker, and Daniel 2012). Ve štěpném místě HA jsou aminokyseliny, které určují afinitu k různým hostitelským proteázám a tím vymezují, v které tkáni bude probíhat životní cyklus viru, tedy tzv. tkáňový tropismus. HA běžné lidské chřipky a LPAI je štěpen pomocí trypsin-like proteázy, která se vyskytuje v dýchacím systému a tím se replikace omezuje na epitel dýchací traktu. Gen pro HA u HPAI obsahuje mutaci, díky které se ve štěpném místě HA nachází dodatečná sekvence bazických AK, které rozšiřují vnímavost k větší škále proteáz a umožňují tak šíření mimo buňky dýchacího systému v podstatě do jakékoliv tkáně těla (Maines et al. 2008; Hamilton, Whittaker, and Daniel 2012). Nezávislost na trypsin-like proteáze například u HA typu 5 vede k typickému výskytu H5N1 v mozku a nervové tkáni (Doherty et al. 2006).

### **2.3. Evoluce chřipky**

Existují dva hlavní mechanismy evoluce chřipkových virů. Jedním jsou malé, bodové mutace, postupně naakumulované v genech pro povrchové antigeny HA a NA, které probíhají náhodnými mutačními procesy. Následkem jsou různé varianty jednoho viru, které se tak dokáží vyhnout imunitním procesům hostitele (což je důvod pro očkování proti chřipce každou novou sezónou). Tento mechanismus evoluce se obecně nazývá antigenní drift (Martcheva 2012). Ten druhý, velmi častý mechanismus evoluce chřipky, se nazývá antigenní shift nebo také reassortment. Při tomto procesu vznikají nové linie viru, které mohou překročit druhovou bariéru a adaptovat se na populaci jiného než původního druhu (Martcheva 2012). Mechanismus antigenního shiftu je takový, že se v jednom hostiteli poskládají nové viriony s genetickou informací ze dvou nebo několika typů viru. Chřipkový virus potřebuje osm segmentů RNA. Pokud se jeden hostitel nakazí dvěma nebo více chřipkovými kmeny, může se při sestavování stát, že se do virionu dostanou segmenty z těchto různých kmenů. Dohromady je tedy v novém viru opravdu osm segmentů genetické informace, každý ovšem může pocházet z jiného chřipkového kmene. K reassortmentu chřipkových virů dochází například u



Obrázek 2 - Vznik nových forem chřipky procesem zvaným reassortment (převzato od Vita Universitas - Časopis VFU Brno 2/2017)

prasat. Různí živočichové mají na povrchu svých buněk glykosylované receptory s N-acetylsialovou kyselinou vázanou na galaktózou buď přes pozici alfa 2,3 (například u ptáků a prasat, ale typicky především v respiračním a intestinálním epitelu vodních ptáků), nebo v pozici alfa 2,6 (například u člověka a prasat). U prasat může tedy probíhat nákaza viry ptačího i savčího typu a dochází tedy k promíchání segmentů od různých virů do nově vznikajícího virionu (Ito et al. 1998). Prasata jsou tedy v tomto případě ukázkou mezihostitele ptačích a lidských virů. Překonání druhové bariéry HPAI z ptáka na člověka nastane, pokud si například virus ptačí chřipky H5N1 promíchá genetický materiál s běžnou sezónní lidskou chřipkou v prasečím mezihostiteli (Martcheva 2012). Z tohoto důvodu je asi nesprávné takovou chřipku označovat jako prasečí, protože jde vlastně o reassortment několika chřipek různých hostitelů. Tímto způsobem mohou vznikat nové typy, proti kterým ještě není vytvořená účinná imunitní obrana, a jsou tedy schopné vyvolávat pandemie.

Dalším mechanismem, který je pravděpodobně velmi důležitý nejen v evoluci ptačí chřipky, ale všech RNA virů, je homologní rekombinace (He et al. 2008). Ta se může vyskytnout u chřipkových genů mezi stejnými či různými subtypy (například rekombinace v genu *PBI* mezi subtypem H5N1 a H5N1, nebo mezi H5N1 a H9N2). U různých subtypů z různých lokalit molekulární analýzy potvrzují vysokou sekvenční podobnost v mnoha genech, například sekvenční podobnost v *PA* genu mezi určitými liniemi H5N1 a H9N2 je větší než 99%, což naznačuje, že je homologní rekombinace přirozeným mechanismem v evoluci, při kterém vznikají nové formy viru (He et al. 2008). Rekombinace v kombinaci s reassort-

mentem mezi různými i stejnými subtypy a mezi viry různých hostitelů zrychluje evoluci viru a umožňuje získat mnoho nových klíčových adaptivních mutací v jednom kroku. Vznikají nové typy, na které hostitelé nejsou imunologicky adaptováni. Díky tomu se ptačí chřipka rychle šíří v tom prostředí, které je pro homologní rekombinaci i reassortment vhodné. Takovým prostředím jsou třeba početné kolonie migrujících vodních ptáků nebo například drůbežárny, kde je na malém prostoru koncentrováno velké množství jedinců různých druhů a kde dochází k úzkému kontaktu mezi domácími a divokými ptáky a lidmi. Některé čínské výzkumy ukázaly, že v drůbežárnách na různých místech v Číně je daleko větší diverzita viru, než u divokých ptáků nebo u drůbeže volně chované na zahradách a biofarmách, kde byla genetická diverzita viru mnohem menší (Chen et al. 2016, 2017). Metodika těchto výzkumů ovšem nebyla příliš podrobně popsána a bez statistických průkazů se na uvedené výsledky nelze příliš spoléhat. Rychlost evoluce a diverzitu ptačí chřipky odráží vysoká koncentrace jedinců různých druhů na omezeném prostranství, jako je například v drůbežárnách. Diverzita v takových velkochovech je obohacována novými virovými geny z nových jedinců a z divokých ptáků, kteří zde mohou žít synantropně, kvůli dostupnosti potravy, a tak zde dochází k masivnímu reassortmentu i rekombinaci z různých druhů. Podobně může ve zvýšené míře probíhat reassortment a rekombinace u lidských chřipkových kmenů ve velkoměstech, tedy na místech, kde je velké množství lidí na jednom místě v kontaktu, jako je hromadná doprava či nemocniční zařízení, čímž je urychlen přenos a vznik nových forem viru v lidských populacích.

## **2.4. Původ vysoce patogenní ptačí chřipky**

První vysoce patogenní typ ptačí chřipky charakterizován hemaglutininem typu 5 a neuraminidásou typu 1 byl poprvé izolován v jižní Číně v roce 1996 z nemocných domácích hus a označen A/Goose/GD/96 (Sims et al. 2005; Weber and Stilianakis 2007). Molekulární analýzy ukazují, že se tento virus pravděpodobně vyvinul mutací nebo reassortmentem z LPAI kolující mezi divokými vodními ptáky, kteří přicházejí do styku s domácí drůbeží (Sims et al. 2005). V prosinci roku 2003 a v lednu 2004 propukla velká epidemie H5N1 téměř současně v osmi asijských státech: v Číně, Kambodži, Indonésii, Japonsku, Koreji, Laosu, Thajsku a Vietnamu a v srpnu 2004 s k nim přidala i Malajsie (Sims et al. 2005; The WHO Global Influenza Program Surveillance Network 2005). Fylogenetické analýzy HA typu 5 této nové vysoce patogenní chřipky z epidemie v letech 2004 a 2005 odlišili dvě různé linie označované jako klad 1 a klad 2. Ty z indočínského poloostrova tvoří klad 1, kdežto viry z okolních zemí patří do kladu 2. Viry izolované z dřívějších let v Číně tvoří klad 1' a 3. Oba klady 1 i 2

mají různorodý motiv ve štěpném místě HA a poblíž receptor-vazebného místa, což jim dává vlastnost HPAI. V porovnání s viry izolovanými v dřívějších letech mají tyto nové z roku 2004 a 2005 v HA substituovaný serin v pozici 129 za leucin, což ovlivňuje vazbu na receptor a substituovaný alanin v pozici 156 za threonin. Právě tato změna je odpovědná za adaptaci viru na terestrickou drůbež a způsobuje u ní vysokou hladinu virulence. Tato substituce navodí glykosylaci asparaginu 154, což snižuje afinitu HA ke kyselině sialové, ale to je vybalancováno delecemi ve struktuře NA, které umožní viru lépe se udržet na plasmatické membráně. Další významnou změnou v kladu 1 je substituce serinu za asparagin v pozici 31 v sekvenci M2 proteinu. Tato změna je zodpovědná za resistenci k amantadinu, významnému antiviroviku (The WHO Global Influenza Program Surveillance Network 2005). Co se týče interních proteinů, ty bývají oproti proteinům na membráně konzervovanější a méně náchylní k mutacím. Nicméně je u HPAI specifická substituce kyseliny glutamové na pozici 627 za lysin v proteinu PB2. Tato mutace zrychluje replikaci virového genomu, a tedy zvyšuje míru virulence. Dále je v proteinu NP1 substituce kyseliny asparagové na pozici 92 za kyselinu glutamovou, díky které je virus rezistentnější proti IFNs a TNF- $\alpha$  (Beigel et al. 2005).

Vysoce patogenní chřipka typu H5N1 se z jihovýchodní Asie šířila spolu s migrujícími ptáky dále směrem na východ, přes střední Asii i na jih do Afriky, až se v roce 2006 dostala do střední Evropy včetně České republiky a proběhla první vlna epidemie ptačí chřipky (Nagy et al. 2007; Weber and Stilianakis 2007). Od roku 2008 se opět v Číně objevují nové subtypy vysoce patogenní ptačí chřipky, které vznikají rekombinací H5N1 a málo patogenních typů chřipek. Vznikly nové vysoce patogenní typy H5N8 a H5N5, které v roce 2014 začali migrující ptáci rozšiřovat směrem do Evropy severní cestou přes Sibiř a do Severní Ameriky. Na podzim roku 2016 se začaly objevovat první případy i ve střední Evropě, přičemž v ČR se první případ objevil na začátku roku 2017. Jedná se tedy o druhou vážnější vlnu ptačí chřipky (podle SVS, [www.svscr.cz](http://www.svscr.cz)).

### **3. Diverzita v imunitní odpovědi na chřipkovou infekci**

#### **3.1. Interakce s hostitelem – rozpoznání viru a zahájení imunitní odpovědi**

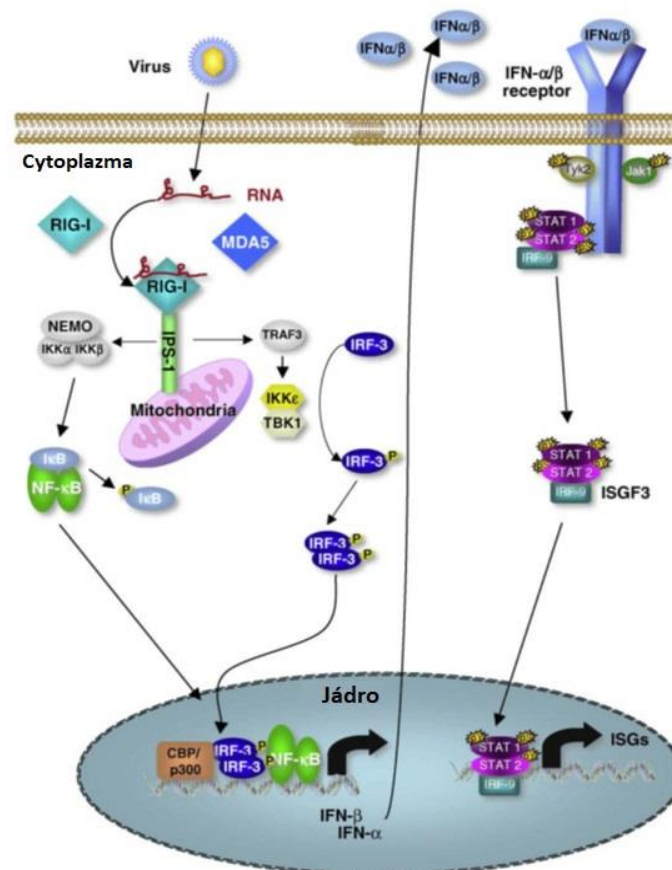
Rozpoznání chřipkového viru v těle hostitele probíhá výhradně intracelulárně. Roli při tom hrají dva důležité receptory a to Retinoic acid Inducible Gene I (RIG-I) a Toll-like Receptor 7 (TLR7). Obecně vedou signální dráhy těchto receptorů k produkci interferonů typu I (tedy IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$ ), které dále vedou k expresi antivirových genů, čímž navozují tzv. antivirový stav a zároveň tvoří most mezi přirozenou a adaptivní imunitou (signalizují například ke

zmnožení T lymfocytů). Ligandem obou receptorů je chřipkový genom, tedy virová ssRNA. Pomocí receptoru TLR7 rozpoznávají virový genom plasmatické dendritické buňky (pDC) (Diebold 2004). Další důležitý faktor je adaptorový protein Myeloid Differentiation factor 88 (MyD88), který je součástí TLR7 signální dráhy, a bez kterého tato signální dráha nefunguje. Jeho deficiencie způsobí, že buňky nejsou schopné reagovat produkcí IFN- $\alpha$  (Diebold 2004). Po rozpoznání ligandu interaguje TLR7 právě s proteinem MyD88. Ten formuje komplex, ve kterém jsou součástí IL-1 receptor asociované kinázy (IRAK 1 a 4) a TNF-receptor asociovaný faktor 6 (TRAF-6), které vedou k aktivaci dvou hlavních signálních drah. Jednak k aktivaci transkripce NF- $\kappa$ B a aktivátorového proteinu 1 (AP-1), což vyúsťuje v produkci prozánětlivých cytokinů. Druhá signální dráha vede přes interakci skrze MyD88 a interferon regulující faktor 7 (IRF-7) k produkci IFN- $\alpha$ . IFN- $\alpha$  indukuje expresi IFN-stimulovaných genů (IFGs), které exprimují důležité antivirové proteiny jako RNA-dependentní protein kináza (PKR), 2',5'-oligoadenylátsyntetáza (OAS) a myxovirus resistantní gen (Mx), který inhibuje virovou polymerázu PB2, čímž zabraňuje transkripci viru (Wei et al. 2013). Různé ssRNA viry (chřipka, vesicular stomatitis virus) jsou rozeznávány právě přes tuto TLR7-MyD88 dráhu (Lund et al. 2004). K rozpoznání chřipky přes tento receptor je pravděpodobně také nutný její vstup do endosomů. V životním cyklu se viriony vážou na buněčný receptor a vstupují do buněk pomocí receptorem zprostředkované endocytózy. Uvnitř vakuoly dochází ke snížení pH, což způsobí konformační změny v hemaglutininu, přichyceném na kyselinu sialovou a umožní fúzi virového obalu s membránou lyzozomu, čímž se uvolní virový genom do cytosolu. pDC ale rozpoznávají virovou RNA pomocí TLR7 již uvnitř endosomu (Lund et al. 2004). Virová ssRNA tedy pomocí TLR7 a MyD88 závislé signální dráhy aktivuje pDC, které začnou produkovat prozánětlivé cytokiny a IFN- $\alpha$ . Cytokiny dále aktivují buňky přirozené imunity a IFN- $\alpha$  vede k expresi genů navozující antivirový stav. Při deficienci TLR7 dochází k výraznému zeslabení produkce IFN- $\alpha$  a úplnému zastavení produkce ostatních cytokinů (Diebold 2004). Savčí TLR7 a MyD88 homology můžeme detekovat i u ptáků (kachny, husy i slepice) a jejich exprese u nich mnohonásobně vzroste krátce po nakažení HPAI typu H5N1 (Wei et al. 2013).

Na rozdíl od TLR7 je RIG-I cytoplazmatický RNA receptor, který rozeznává virovou ssRNA volně v cytoplazmě. Signální dráha vede opět k produkci IFNs typu I (konkrétně IFN- $\beta$ ), které ovlivňují expresi podobných antivirových genů jako v případě dráhy TLR7. Exprese těchto genů neprobíhá například u RIG-I deficientních myší (Barber et al. 2013). Mimo IFN- $\beta$  dochází k aktivaci exprese i dalších cytokinů, například IL-6 (Pichlmair et al. 2006). Odlišností od buňce vlastní jednořetězcové RNA může být fosforylace trifosfátem na 5' konci.

RIG-I tedy váže především 5'-trifosfát ssRNA, bez čepičky a s dvojřetězcovými úseky (Pichlmair et al. 2006). Podle role RIG-I v savčí imunitě se hledal homolog tohoto receptoru u ptáků. Identifikován byl například u kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) či zebřičky (*Taeniopygia guttata*). U domácí i divoké formy kura (*Gallus gallus*) v oblasti genomu, kde se gen pro RIG-I vyskytoval u kachny a zebřičky, identifikován nebyl (Barber et al. 2010, 2013).

Na dráhy TLR7 a RIG-I navazuje signální dráha JAK-STAT. Transmembránový protein JAK funguje jako receptor pro IFNs typu I. IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$  tedy spouští signální kaskádu JAK-STAT, která vede k produkci IFN-stimulovaných genů, mezi něž patří již zmíněné antivirové proteiny OAS, PKR a Mx (Yoneyama and Fujita 2009; Wilkins and Gale 2010). Vzhledem k tomu, že u kura je v reakci na ptačí chřipku produkováno menší množství IFNs díky absenci RIG-I signální dráhy, je tedy signální dráha JAK-STAT down-regulovaná, což má za následek sníženou produkci antivirových proteinů. Mimo to je součástí této signální dráhy protein STAT-3, který působí protizánětlivě. Jeho aktivace blokuje prozánětlivou cytokinovou odpověď (Kuchipudi et al. 2014). V kuřecích buňkách nakažených HPAI dochází k nižší expresi tohoto proteinu oproti buňkám kachním nakažených stejným typem HPAI.



Obrázek 3 – Signální dráhy vedoucí od rozpoznání virové ssRNA receptorem RIG-I k produkci interferonů typu I, aktivující JAK-STAT signalizaci ovlivňující expresi interferon stimulujících genů s antivirovou funkcí (převzato a upraveno podle Wilkins and Gale 2010)

Jeho exprese je u kuřat až o polovinu menší než u kachen (Kuchipudi et al. 2014). Vlivem absence RIG-I u kura tedy chybí jedna signální dráha produkující IFNs typu I, které ovlivňují JAK-STAT signalizaci. JAK-STAT dráha je tedy down-regulovaná, což má za následek sníženou produkci antivirových proteinů, takže se virus může snadněji množit. Dále je snížena produkce proteinu STAT-3, který zabraňuje zánětu. Vzhledem k tomu, že se HPAI může šířit do všech typů tělních tkání, vede to tedy k přehnanému zánětu po celém těle. Zánět samozřejmě poškozuje i tělu vlastní buňky, takže může dojít k hromadnému poškození až selhání orgánů vedoucí ke smrti hostitele.

To by mohl být jeden z hlavních rozdílů v imunitní odpovědi a vysvětlení, proč jsou slepice na ptačí chřipku tak náchylné, když kachnám téměř neškodí. (Barber et al. 2010) provedli experiment, při kterém nakazili kachny vysoce patogenním typem ptačí chřipky H5N1. Následně došlo k výraznému zvýšení exprese *RIG-I* v infikovaných plicích a to i více než 200krát hned první den po infikování, přičemž třetí den už byla exprese velmi malá, což může vypovídat o tom, že to je jen časná a přechodná reakce. Po transfekci kachního *RIG-I* genu do kuřecích experimentálních buněk, které ho postrádají, došlo u těchto buněk po přidání typických ligandů k RIG-I signalizaci a produkci IFN- $\beta$ . RIG-I je tedy silně exprimován u kachen na počátku infekce chřipkou. Jeho signální dráha vede k aktivaci exprese IFN- $\beta$ , který aktivuje expresi antivirových genů, takže může dojít k rychlé neutralizaci chřipkových virů. U kuřat tento receptor chybí, takže i když jsou do obrany proti chřipkové infekci zapojeny jiné dráhy jako TLR7, nebo MDA-5 (melanoma differentiation associated gene-5, receptor podobný RIG-I, který zahrnuje podobné komponenty a spouští podobnou dráhu, včetně exprese IFN- $\beta$ ), nestačí to k zabránění propuknutí chřipkové infekce. Kromě aktivace antivirových genů dochází při signalizaci těchto receptorů k redukci exprese matrixových genů viru. Během chřipkové infekce se také tvoří dsRNA, která může být dalším potenciálním stimulem pro aktivaci přirozené imunity. Chřipkové viry ovšem vlastní gen *NSI*, který exprimuje NS1 protein. Ten má RNA vazebnou doménu na N-konci, kterou se váže na dsRNA, rozvolňuje ji a zabraňuje tak rozpoznání a vyvolání produkce cytokinů (Diebold 2004).

Jedním z IFN-stimulovaných genů, který je exprimován působením IFNs, je tetherin. To je protein, který má antivirovou funkci a uplatňuje se v boji proti některým obaleným virům. Dokáže limitovat replikaci viru navázáním jedním koncem na obal viru a druhým na plasmatickou membránu infikované hostitelské buňky, čímž zabraňuje jeho uvolnění (Gnirß et al. 2015). Díky této vlastnosti se hovořilo o jeho využití v léčbě a boji proti chřipce, nicméně chřipky typu A (ať už koňské, ptačí, lidské nebo prasečí) nejsou na tetherin příliš citlivé. Jeho funkci pravděpodobně brání molekuly HA a NA, které působí jako jeho anta-

gonsti. (Bruce et al. 2012). Namísto něj se proti chřipce uplatňuje rodina tzv. *IFITM* (IFN-induced transmembrane protein) genů. IFITM jsou opět proteiny, jejichž exprese je stimulována působením IFNs. U savců a člověka je identifikováno několik členů této genové rodiny, např. *IFITM1*, *IFITM2*, *IFITM3* a *IFITM5*, jejichž produkty mají antivirovou funkci. Předpokládá se, že zabraňují splynutí virového obalu s membránou endosomu, ovlivněním složení fosfolipidů v membráně, ale přesný mechanismus je zatím nejasný (Diamond and Farzan 2013). V nedávné době byly členové této genové rodiny objeveny i v ptačím genomu a byla jim přiřazena také antivirová funkce. U ptáků je ale rozdíl v regulaci exprese těchto genů. Zatímco u kachen byla v reakci na HPAI silně zvýšená exprese genů pro *IFITM1*, 2 a 3, u kuřat to bylo jen velmi málo, což může mít vliv na rozdílnou imunitní odpověď. Zajímavé jsou také výsledky fylogenetické analýzy, které ukazují, že zatímco u savců se členové této genové rodiny vyvíjeli a předávali do různých linií pospolu, u ptáků došlo k silné pozitivní selekci hlavně na *IFITM1* genu v kachní linii (Smith et al. 2015).

### 3.2. Obecná imunitní odpověď a příznaky při chřipkové infekci

Infekce běžnou chřipkou u člověka (případně u savců a většiny ptáků) je omezena na buňky dýchacího systému (Maines et al. 2008; Doherty et al. 2006). Šíří se kapénkově a její příznaky jsou obecně běžně známé: bolest hlavy, šíje, svalů, kloubů, rýma, kašel a v některých případech i zažívací problémy. Závažnější potíže mohou nastat u dětí a starších lidí, kde hrozí sekundární bakteriální pneumonie, či jiná chronická plicní onemocnění. Příznaky chřipky obvykle do jednoho týdne odezní. V časných stádiích infekce fungují v obraně hlavně alveolární makrofágy a neutrofilové. Makrofágy zahajují zánět produkcí cytokinů IFNs typu I vedoucí k produkci antivirových proteinů. U člověka zahajují také respirační vzplanutí a produkci NO, které je působením viru potlačováno (Suarez and Schultz-Cherry 2000; Lyon and Hinshaw 1993). Tím se snižuje mikrobicidní funkce a hrozí případná sekundární bakteriální infekce. V pozdějších stádiích se proti infekci uplatňují chřipkově specifické CD4<sup>+</sup> a hlavně CD8<sup>+</sup> T lymfocyty. Ty jsou aktivovány jednak v lymfatických uzlinách a slezině antigeny, které sem přináší dendritické buňky (DC) z dýchacího traktu a také prozánětlivými cytokiny produkovanými makrofágy (Doherty et al. 2006). V buňkách dýchacího systému byla detekována exprese prozánětlivých cytokinů IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$ . Dále je zvýšená exprese chemotaktických proteinů MIP-1 $\alpha$  a MCP-1, které do infikovaného místa navádějí lymfocyty a monocyty (Maines et al. 2008). Zvýšená hladina cytokinů vyvolává typické příznaky, včetně horečky. Chřipkově specifické CD4<sup>+</sup> T lymfocyty podporují protilátkovou odpověď, ale nejsou hlavními efekty v boji proti chřipkové infekci. Jejich

proliferace je menší a ne tak specifická, jako odpověď  $CD8^+$  T buněk, ovšem paměťová stopa se v  $CD4^+$  chřipkově specifických buňkách v myších modelech zachovává předem připravená po celý život, čímž se při každé další infekci podporuje účinnější protilátková odpověď. Hlavní slovo při obraně během chřipkové infekce mají ale  $CD8^+$  efektorové T lymfocyty.  $CD8^+$  T lymfocyty eliminují chřipkou infikované plicní buňky cytotoxicky. Cytotoxicita  $CD8^+$  buněk proti chřipkou infikovaným buňkám je zajištěna dráhou CD69 (Fas) nebo perforin-granzymy. Chřipkově specifické  $CD8^+$  T lymfocyty si také uchovávají paměť, díky které při každé další infekci dokáží rychleji proliferovat a rychleji redukovat množství virových částic (tedy virový titr) (Doherty et al. 2006). Tyto chřipkově specifické  $CD8^+$  T buňky jsou zaměřeny na epitop na NP nukleoproteinu, který je velmi konzervovaný a neměnný u mnoha typů chřipkových virů, a tak mohou paměťové  $CD8^+$  T buňky reagovat i zkříženě na jiný typ chřipky, včetně HPAI (Kreijtz et al. 2008). Z přirozených protilátek dochází k sekreci hlavně slizničního IgA lokálně, v místě infekce v dýchacím epitelu a systémově IgG, který je i léta po infekci produkován plasmatickými buňkami. Protilátky se snaží neutralizovat životní cyklus viru navázáním na epitop nějakého z virových proteinů, přičemž důležitý pro zahájení protilátkové odpovědi je některý z povrchových proteinů, proti kterým funguje i většina protilátek (Doherty et al. 2006). Další z obranných mechanismů je T buněčně závislá produkce  $IFN-\gamma$  NK buňkami. Lidské NK buňky exprimují receptor CD56. Ten má dva podtypy  $CD56^{dim}$  a  $CD56^{bright}$ .  $CD56^{dim}$  jsou tzv. buňky s expresí na nízké hladině. Tyto NK buňky fungují spíše cytotoxicky.  $CD56^{bright}$  jsou naopak tzv. buňky s expresí na vysoké hladině, u kterých dochází k velké produkci cytokinů (např. IL-12, IL-15, IL-18 a IL-1b) včetně  $IFN-\gamma$ . Během chřipkové infekce roste počet specifických T buněk, které mimo jiné produkují IL-2. Ten působí na oba typy  $CD56$  NK buněk jako signál k produkci  $IFN-\gamma$ . Produkce  $IFN-\gamma$  je přímo úměrná míře T buněčné odpovědi na chřipkovou infekci, je tedy silně závislá na produkci IL-2 T buňkami.  $IFN-\gamma$  má imunoregulační a přímou antivirovou funkci (X.-S. He et al. 2004).

U kura a kachen, popřípadě dalších ptáků, se při infekci běžnou LPAI většinou nevykytují žádné větší klinické příznaky (Muzyka et al. 2017). Imunitní odpověď probíhá v podstatě stejným způsobem jako u lidí a ostatních savců. Do dýchacího traktu putují makrofágy, které mají stejnou roli jako ty savčí. Také produkují zánětlivé cytokiny, fagocytují cizí částice, včetně buněk podstupující apoptózu a nekrózu a prezentují antigeny T buňkám. Tak dochází ke zmnožení chřipkově specifických  $CD4^+$  a  $CD8^+$  T lymfocytů. Se zvyšující se hladinou lymfocytů se zvyšuje hladina dalších cytokinů jako  $IFN-\gamma$ , IL-2 a IL-15. Z protilátek je kromě slizničního IgA zvýšená také hladina IgM, dále pak IgG a IgY.

### 3.3. Imunitní odpověď a příznaky při infekci HPAI u savců a člověka

HPAI (typu H5N1) se na lidi přenáší opět kapénkově a hlavně přímým kontaktem s nakaženými ptáky (viz kapitola 4.). Inkubační doba je delší než u běžné chřipky. Uvádí se dva, čtyři až osm dní po nakažení (Beigel et al. 2005). Typickými počátečními příznaky, které se vyvíjí brzy v průběhu onemocnění, jsou převážně potíže dolních cest dýchacích, kašel, dušnost, chraptot, zrychlené dýchání, krvácení z nosu, někdy pneumonie a ARDS. Kromě problémů s dýchacím systémem se také při infekci vyskytují vysoké teploty (i nad 38 °C) a gastrointestinální potíže zahrnující průjem, vodnatý průjem, zvracení, bolest břicha a krvácení z dásní. V jednom dětském případě se objevili i neurologické potíže a v nejtěžších případech dochází k selhání orgánů a smrti do devíti dnů od objevení příznaků (Maines et al. 2008; Beigel et al. 2005; Zitzow et al. 2002). U fretek a myši byly některé linie kmene H5N1 100% letální. Hlavním problémem při infekci HPAI je její vysoká míra virulence oproti běžné chřipce, schopnost replikace i v jiných tkáních těla než jen v dýchacím systému, a vliv na funkci imunitního systému, specificky na produkci prozánětlivých cytokinů. Výsledkem toho dochází v reakci na vysokou míru replikace k masivní migraci makrofágů do infikovaných tkání a deregulaci produkce cytokinů a chemokinů, tedy k tzv. cytokinové bouři, která se projevuje masivní expresí prozánětlivých cytokinů v mnoha tkáních těla, což vede k systémovému zánětu. V sérech nakažených pacientů i v myším modelu byla detekována mnohonásobně zvýšená exprese prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha$  i  $\beta$ , MIP-2, MCP-1 a RANTES. Díky této deregulaci cytokinové odpovědi a systémovému zánětu dochází v mnoha orgánech k silnému poškození, apoptózám, nekrotázám a hemorrhagiím. Produkce cytokinů v CNS způsobuje u fretok i myši ztrátu na hmotnosti a může vést i ke smrti (Wang et al. 2016; Maines et al. 2008). Mimo jiné se H5N1 replikuje i v sekundárních lymfatických uzlinách, kde způsobují úbytek chřipkově specifických T lymfocytů. Zvýšená hladina TNF- $\alpha$  a jemu příbuzných proteinů (například TRAIL, tedy TNF-apoptosis inducing ligand) v reakci na přítomnost viru vyvolává apoptózu u CD4CD8 double-positivních thymocytů, což vede k vyčerpání a nedostatku periferních lymfocytů, tedy k periferní lymfopenii, při které se sníží počet CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů až o 80 % (Tumpey et al. 2000). Tato strategie způsobuje utlumení T-buněčné obrany a produkci T-buněčných cytokinů. Například IFN- $\gamma$  je v časně fázi masivně produkován NK buňkami, takže je jeho hladina velmi vysoká, v průběhu infekce se ale drasticky snižuje se snižujícím se počtem T lymfocytů. Infikované buňky nejsou nijak likvidovány a virus se tedy množí nekontrolovatelně dál. Oproti běžné chřipce způsobuje HPAI zeslabení odpovědi pomocí IFNs typu I, která je kritická už v časně fázi infekce.

Protein NS1 ptačí chřipky obsahuje mutaci, díky které je schopen blokovat RIG-I dráhu vedoucí k expresi IFN- $\beta$ . Tím pádem dochází k oslabení dráhy JAK-STAT, která reguluje prozánětlivou odpověď a vede k produkci antivirových ISG. Zeslabení a opoždění RIG-I – JAK-STAT odpovědi jakožto prvního obranného mechanismu v buňkách epitelu dýchacích cest umožňuje vysoce patogenní ptačí chřipce onu zvýšenou virulenci a rychlé rozšíření viru z dýchacího systému do dalších tkání. Zároveň je tím oslabena regulační funkce tvorby prozánětlivých cytokinů, které jsou produkovány ve větší míře (Zeng et al. 2007).

### **3.4. Imunitní odpověď a příznaky při infekci HPAI u ptáků**

Z ptačích druhů se jako modelové organismy pro výzkum imunitní odpovědi na ptačí chřipku využívají především slepice a kachny. Zatímco u kachen, jako u dobře adaptovaného hostitele, se při infekci většiny kmenů ptačí chřipky nevyskytují žádné klinické ani patologické příznaky, u kura dochází k podstatně vážnějšímu průběhu onemocnění. Mezi typické klinické příznaky u kura patří rozčuchané a načepýřené peří, dýchací potíže a příznaky nachlazení, výtoky z nosu, průjem, neurologické poruchy jako apatie, nekoordinované pohyby a třes hlavy. Na různých místech se objevují krvácivé boláky, snižuje se příjem potravy a u hospodářských druhů se snižuje snůška vajec, která mohou být deformovaná a se slabou skořápkou (podle SVS, [www.svs.cz](http://www.svs.cz)). Počáteční imunitní děje jsou u obou druhů v podstatě stejné. Do infikované plicní tkáně směřují makrofágy, produkující prozánětlivé cytokiny a předkládající antigeny T lymfocytům, načež dojde k pomnožení chřipkově specifických CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů, které začínají vykonávat stejné funkce jako u savců. Co se ovšem liší, je načasování a míra těchto dějů. U kachen nastává zánětlivá odpověď velmi rychle po infikování (Cornelissen et al. 2013; Kuchipudi et al. 2014). Makrofágy začnou rychle produkovat prozánětlivé cytokiny (např. IL-6 a IL-1 $\beta$ ), ovšem v běžné míře. Rychlá zánětlivá odpověď zabraňuje zvýšené virulenci. Již velmi brzy zakročí také cytotoxické CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, které vyvolávají apoptózu infikovaných buněk, čímž udrží virus v epitelu dýchací a trávicí soustavy a nepustí ho do dalších tkání, takže je z těla rychle vyplaven fekální cestou, popřípadě orofaryngeálně. Rychlý nástup prozánětlivé odpovědi a apoptózy tedy limituje replikaci viru HPAI v plicích, popřípadě v trávicí trubici čímž se redukuje klinické a patologické příznaky. U kura je prozánětlivá odpověď oproti kachně opožděná, ale velmi přehnaná (Cornelissen et al. 2013). Je možné, že opožděná odpověď u kura nastává díky absenci jednoho typu receptoru rozpoznávající chřipkový virus (RIG-I) (Barber et al. 2013). Současně dochází k slabé aktivaci dráhy JAK-STAT, která reguluje zánětlivou odpověď, a proto dochází k tak silné expresi prozánětlivých cytokinů po celém těle, díky schopnosti HPAI pronikat z dýchací soustavy do

dalších tkání těla (Kuchipudi et al. 2014). Makrofágy i T lymfocyty zahajují svoji činnost opožděně, takže nestihnou udržet virus v dýchací soustavě a tak se rozšíří i do jiných tkání. Zároveň je míra replikace viru daleko větší než u kachny (Cornelissen et al. 2013). Opožděná odpověď působí nejen v plicích, ale i v ostatních tkáních kam se virus rozšířil. Hladiny prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-1 $\beta$  a IFN- $\gamma$  u kura jsou daleko větší než u kachny. Makrofágy také produkují ROS a vlivem nadprodukce IFN- $\gamma$  také množství NO, které sice mají mikrobicidní aktivitu, ale v takto zvýšené míře působí spíše škodlivě (Suarez and Schultz-Cherry 2000). Pozdě spuštěná prozánětlivá odpověď je tedy neadekvátní a kromě toho, že nedokáže virus řádně zneškodnit, způsobuje poškození orgánů. Vedle přehnaného zánětu dochází v tkáních také k apoptóze. Vlivem přehnané zánětlivé odpovědi a apoptózy v CNS dochází k již zmíněným neurologickým poruchám. U ostatních orgánů způsobí tak silná poškození, že dochází k multiorgánovému selhání a smrti jedince.

### **3.5. Imunopatologie způsobené nákazou HPAI**

Vážnost onemocnění HPAI je dána patologickým poškozením mnoha orgánů, které je připisováno nadměrným působením prozánětlivých cytokinů v tkáních, kde se virus replikuje. U savců toto platí například u myší, fretok a domácích koček. U těchto druhů existuje korelace mezi detekcí viru imunohistochemickými metodami v tkáních a poškozením dané tkáně zahrnující léze a nekrózy v plicích, mozku, ledvinách, srdci, játrech a nadledvinách (Rimmelzwaan et al. 2006; Maines et al. 2008). Poškození plic je způsobeno ARDS vyvolaným makrofágy v plicních alveolách. Zde je nahromaděná tekutina a alveolární makrofágy spolu s fibrinem. V krevním séru je díky poškození jater zvýšená hladina aminotransferáz, což je spolu se snížením počtu bílých krvinek metoda laboratorní diagnostiky infekce ptačí chřipkou i u lidských pacientů (Beigel et al. 2005). U primátů, konkrétně u makaků (*Macaca fascicularis*) dochází k velmi těžkým plicním poškozením působením ARDS. Objevují se nekrózy, hemorrhagie v alveolech, plnění alveolárních prostor fibrinózními výměšky a krvinkami, dochází k odlupování plicního epitelu a tvorbě hyalinní membrány. Z dalších orgánů se objevují nekrózy na sekundárních lymfatických orgánech, ledvinách a játrech. Často bývá ovlivněna i trávicí soustava, mozek a myokard (Dejong and Hien 2006; Beigel et al. 2005). Virus byl ovšem imunohistochemickými metodami detekován pouze v plicní tkáni a přilehlých lymfatických uzlinách. U lidských pacientů byly zaznamenány v podstatě stejné patologické příznaky jako u makaků. U obou dochází k multiorgánovému selhání, přestože byl virus detekován pouze v plicní tkáni, která je na tom z hlediska poškození nejhůře. Je možné, že vliv nadměrného ARDS se rozšíří z plic i do jiných tkání a způsobí tak vážné poškození dalších

vnitřních orgánů mimo dýchací soustavu (G. F. Rimmelzwaan et al. 2001; Kuiken et al. 2003).

U ptáků se vyskytují druhy s velmi vážnými patologickými příznaky, jako jsou léze, hemorrhagie a nekrózy způsobené zánětem v plicích, mozku, lymfatických orgánech, pankreatu, ledvinách, játrech, srdeční i kosterní svalovině (Maines et al. 2008; Perkins and Swayne 2003). V nervové soustavě často dochází k encefalitidám, neurodegeneraci a nekrotickým gliových, ependymových, či Purkyňových buněk, což se projevuje pozorovatelnými neurologickými dysfunkcemi, typicky poruchy orientace a pohybu. Játra a slezina bývají často zvětšené a s nekrotickými oblastmi. V lymfatických orgánech thymu, burse, peyerových plátech a slezině dochází k vyčerpání lymfocytů a atrofii. Na pankreatu jsou zřetelně viditelné skvrny. Někdy dochází i k vakuolizaci myokardocytů a selhání srdeční funkce. Tato poškození se vyskytují typicky u hrabavých, např. u různých plemen slepic, krocanů (*Melagris galopavo*), křepelky (*Coturnix coturnix japonicus*) a křepelů (*Colinus virginianus*), perliček (*Numida meleagris*), bažantů (*Phasianus colchicus*) a orebic (*Alectoris chukar*), dále například u zebříček, labutí (*Cygnus olor* a *Cygnus cygnus*) a strak (*Pica pica sericea*) (Mo et al. 1997; L. Perkins and Swayne 2001; Leigh Perkins and Swayne 2002; Perkins and Swayne 2003; K. Y. Kwon et al. 2010; Teifke et al. 2007). O něco mírnější poškození vykazuje husa (*Anser anser*), emu (*Dromaius novaehollandiae*), andulka (*Melopsittacus undulatus*) a hýl (*Carpodacus mexicanus*). U všech těchto druhů se shodovala přítomnost viru v daných tkáních s jejím poškozením (Perkins and Swayne 2003). Jsou také druhy, u kterých se patologické příznaky nevyskytují, nebo jsou velmi omezené. Například u kachen divokých a kachniček mandarínských (*Aix galericulata*), vrabce domácího (*Passer domesticus*), či racka (*Larus atricilla*) se vyskytuje jen mírné poškození plic, což odpovídá typicky kachní imunitní odpovědi, při které je replikace viru udržena pouze v epitelu dýchacího traktu (J.-H. Kwon et al. 2017). Zajímavé je, že například u špačka (*Sturnus vulgaris*) a holuba (*Columba livia*), se žádné patologické příznaky ani přítomnost viru v žádných tkáních neprokázali (Perkins and Swayne 2003).

## 4. Šíření ptačí chřipky mezi různými druhy

### 4.1. Ptáci

Za přirozený rezervoár všech chřipkových subtypů se běžně udávají ptáci mokřadního a vodního prostředí z řádu vrubozobých (Anseriformes), který zahrnuje čeleď Anatidae, kam patří rody jako kachny, husy a labutě, u kterých nalezneme viry se všemi typy HA (Olsen et al. 2006). Dále se udává řád dlouhokřídlí (Charadriiformes), zahrnující jednak čeleď rackovití

(Laridae) a jednak podřád bahňáci (Charadrii), do kterého se řadí čeledi slukovití (Scolopaciidae) a kulíkovití (Charadriidae), u nichž se vyskytují viry s HA typu 1 až 12. Jedinci z řádů Charadriiformes a Anseriformes často migrují na dlouhé vzdálenosti. Některé studie naznačují, že jelikož je migrace na dlouhé vzdálenosti jedna z nejnáročnějších fyzických aktivit, která ovlivňuje různé fyziologické funkce, včetně aktivity imunitního systému (čímž ztrácí efektivitu), tak hostitel není schopen efektivně bojovat proti patogenům (Weber and Stilianakis 2007). Migrace v kombinaci s přítomností patogenu může hostitele velmi oslabit nebo zhubit, čímž by nebyl schopen šířit daný patogen mezi různými geografickými oblastmi. Počet druhů parazitů u migrujících ptáků je přímo úměrný s migrační vzdáleností. Hostí tedy více parazitických druhů (než příbuzní nemigrující ptáci) z každé geografické oblasti, kterými prolétávají. Proto zde byl selekční tlak na mechanismy, jak se vypořádat s větší diversitou parazitů. Velmi dobří letci tedy mají dobře adaptovaný imunitní systém (mají například větší obranné imunitní orgány než příbuzní nemigrující ptáci), takže mohou překonávat velké vzdálenosti téměř bez jakéhokoliv vlivu patogenu na zdraví jedince (Møller and Erritzøe 1998). Ti horší letci si během migrace dělají přestávky, přičemž rozšiřují daný patogen na kratší vzdálenosti (Hasselquist et al. 2007; Weber and Stilianakis 2007). Na svých stanovištích se během migrací setkávají v obrovských koloniích s ptačími populacemi různých druhů, včetně třeba jedinců z čeledi chřástalovití (Rallidae), buňňákovití (Procellariidae) nebo kormoránovití (Phalacrocoracidae), z různých míst a kontinentů a roznášejí tak LPAI a běžné chřipky mezi státy. Při cestách se dostávají do styku i se svými domestikovanými příbuznými, kteří žijí v kontaktu s drůbeží a domácími zvířaty. Typicky se mezi divokými ptáky a domácí zvěří šíří kmeny ptačí chřipky s HA typu 5, 7 a 9, konkrétně například H5N1, H5N8, H7N7, H9N2 (J. Liu 2005). Největší diverzita virů je pak na místech s velkým množstvím drůbeže a domácích ptáků na jednom místě, kde dochází k rychlému přenosu a tedy rychlým evolučním procesům, tedy například v některých zemědělských zařízeních, farmách, drůbežárnách, či na trzích se zvířaty v exotických zemích. Na takových místech dochází k setkávání domácích, hospodářských, divokých i synantropních druhů, které se dostávají do kontaktu a sdílejí zdroje potravy a vody. Voda a vodní prostředí je obecně ideální pro přenos infekce, jelikož chřipkový virus zůstává infekční ve vodě po celkem dlouhou dobu, například 4 dny při teplotě 22 °C a dokonce více než 30 dní při 0 °C (Olsen et al. 2006). Hlavní ptáci, kteří virus šíří jsou tedy kachny, např. běžná kachna divoká nebo kachnička mandarínská, u nichž probíhá infekce rychle a virus je vyplavován fekální cestou po omezeně krátkou dobu, ovšem v množství, při kterém se snadno infikují další jedinci (J.-H. Kwon et al. 2017). Mezi

typické synantropní druhy patří například vrabec domácí, který dokáže po umělém nakažení dlouhodobě (tj. několik dní do úmrtí) šířit virus orofaryngeálně i fekálně s tím, že je upřednostněna orofaryngeální cesta (Forrest, Kim, and Webster 2010). Stejným způsobem dokáží šířit virus i straky (K. Y. Kwon et al. 2010). Tyto dva běžné druhy tak mohou v přírodě fungovat jako mezihostitelé mezi divokými migrujícími ptáky a domácí drůbeží. U holubů, včetně domestikovaných forem, se předpokládalo, že virus příliš nešíří. Po nakažení nejsou pozorovány žádné klinické ani patologické a virus je vyplavován z těla jen velmi málo nebo vůbec (Leigh Perkins and Swayne 2002; Perkins and Swayne 2003) a dokonce ani nejsou schopni nakazit další jedince (konkrétně kuřata) v přímém kontaktu (Y. Liu et al. 2007). Některé novější studie ovšem naznačují, že holuby vyplavují virus ve velkém množství, které je schopné nakazit další jedince (J.-H. Kwon et al. 2017). Rozdílem je zkoumaný subtyp viru. Zatímco ve starších pracích byl zkoumán subtyp H5N1, v aktuálnějších experimentech byl použit novější subtyp H5N8. Vzhledem k rozšíření, absenci jakýchkoliv příznaků a rezistenci vůči viru by holubi znamenali velkou hrozbu v šíření nákazy. Pro domácí drůbež bývá nákaza fatální. Dochází k rychlému usmrcení, a doba pro efektivní šíření viru je tedy krátká. Podobně tomu je například u labutí, kterou infekce dokáže také rychle zahubit a virus se tím pádem šíří v omezeném množství (Nagy et al. 2007). HPAI byla detekována i u některých druhů patřících do běžně chovaného zájmového ptactva – pěvců a papoušků. Například zebřičky a andulky jsou k HPAI vnímavé a objevují se u nich typické klinické příznaky, které mohou vyústit ve smrt jedince (Boseret et al. 2013; Perkins and Swayne 2003). Domácí zájmové ptactvo se může nakazit od divokých druhů, pokud je chováno ve venkovních voliérách, popřípadě je virus šířen díky černému obchodu s exotickým ptactvem. Pašování jedinci neprochází veterinární kontrolou a je to tak další možnost, jak je virus šířen spolu s ptáky ze své domoviny do dalších oblastí. Takto byl například přenesen subtyp H9N2 spolu s pašovanými alexandry *Psittacula krameri manillensis* z Pákistánu do Japonska (Mase et al. 2001).

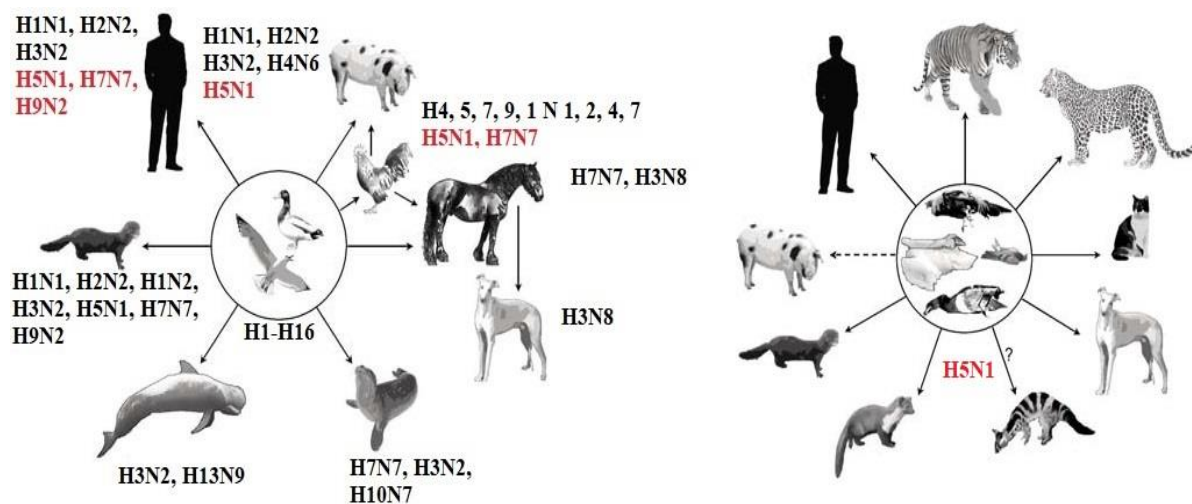
## 4.2. Savci

U savců se za velký rezervoár chřipkových virů považují prasata (Lipatov et al. 2008; Reperant 2009). Prasata mohou být infikováni různými typy chřipek, včetně vysoce patogenní H5N1. Infekce probíhá spíše s mírnými chřipkovými příznaky a je omezena na epitel dýchací soustavy. V porovnání s jinými typy chřipkových virů, ale dochází k vyplavování H5N1 v menším množství. I tak jsou prasata významnými přenašeči chřipkových virů, včetně nových subtypů (Lipatov et al. 2008). Kočkovité šelmy, včetně domácích koček, se vždy považovaly za rezistentní vůči chřipce typu A. Ovšem během epidemií ptačí chřipky bylo zaznamenáno

několik případů nakažení domácích koček i větších kočkovitých šelem chovaných v zoologických zahradách. Jedním z takových případů bylo náhlé úmrtí dvou leopardů a dvou tygrů v prosinci roku 2003 v zoologické zahradě Suphanburi v Thajsku (Keawcharoen et al. 2004). Ve vzorcích odebrané plicní tkáň byl detekován virus H5N1. Předpokládá se, že se zvířata nakazila potravou, kterou byly drůbeží mršiny. V té době právě v této oblasti probíhala první vlna ptačí chřipky. Virus cirkuloval mezi drůbeží a mohl se tak dostat do potravy pro zvířata. Další velký případ nastal v tygří zoo Spirarcha v Thajsku v říjnu 2004, kde se nakazilo velké množství tygrů, také pravděpodobně z infikovaných mršin. Několik tygrů dokonce zemřelo a další museli být utraceni, protože se virus šířil i mezi tygry a počet nakažených narůstal (Thanawongnuwech et al. 2005). V obou případech měli tygři podobné příznaky zahrnující vysokou horečku, ARDS a neurologické poruchy. Při pitvě pak byli nalezeny léze a hemorragie na mnoha orgánech, hlavně na plicích a poškození jater, které doprovází zvýšená hladina jaterních enzymů alanin aminotransferázy a aspartát aminotransferázy v krvi (Keawcharoen et al. 2004). Stejně klinické i patologické příznaky se vyskytují i u domácích koček nakažených ptačí chřipkou (Songserm, Amonsin, Jam-on, Sae-Heng, Meemak, et al. 2006). V těchto případech bylo v oblasti s výskytem HPAI pozorováno, že daná kočka pozřela ptáka. Během vlny ptačí chřipky v roce 2006 v Evropě se do blízkosti nakažených ptáků v Rakousku dostalo několik domácích koček, ovšem nebylo pozorováno, že by nějaká z koček nějakého z ptáků pozřela a později u nich nebyli pozorovány žádné klinické příznaky (Leschnik et al. 2007). (Kuiken 2004) provedl umělé nakažení několika domácích koček virem H5N1 typu. Už v prvních dnech po inokulaci se objevily typické klinické příznaky a jedna z koček šestý den uhynula. Kočky vylučovali virus v relativně nízkých titrech, hlavně proto, že se virus replikuje převážně v dolních cestách dýchacích, kde se také sedmý den po inokulaci objevily nekropsie zahrnující alveolární poškození, či konsolidace plic. Jediné evidence HPAI u kočkovitých šelem jsou tedy ojediněle pozorované případy pravděpodobného nakažení pozřením infikovaných ptáků a umělá experimentální inokulace. I tak lze tvrdit, že je vysoce patogenní forma ptačí chřipky schopná infikovat domácí kočky i větší druhy jako tygry a levharty a je schopná se i přenášet mezi jedinci daného druhu. Přenos z kočky na člověka zatím popsán nebyl. Podobně jako kočky na tom jsou i domácí psi. Donedávna u nich také nebyly zaznamenány žádné případy chřipkové infekce, ale dnes se u psů postupně izolují chřipkové kmény, které se na ně adaptují z jiného hostitele. Virus způsobuje jen mírné nebo běžné příznaky chřipky a po adaptování se dokáže šířit i na další psí jedince. Takto jsou například popsány případy nakažení psa lidským virem H1N1 (Lin et al. 2012), lidskou i ptačí linií viru H3N2 (Song et al. 2009, 2008) a koňským virem H3N8 (Crawford 2005). Velmi

náchylní jsou psi také na vysoce patogenní virus H5N1. Jedinci se mohou nakazit například požitím infikovaného ptáka, či kapénkově mezi sebou. Nakažení jedinci vykazují vážné klinické i patologické příznaky. Objevují se u nich podobné léze a nekrózy na mnoha orgánech jako u jedinců ostatních druhů. Je možné, že domácí psi mohou fungovat jako mezihospitelé a přenášet tento virus i na člověka (Y. Chen et al. 2010; Songserm, Amonsin, Jam-on, Sae-Heng, Pariyothorn, et al. 2006). Z dalších savců jsou na ptačí chřipku vnímavé fretky, které jsou ovšem vysoce vnímavé k jakémukoliv typu chřipky. U koní a tuleňů byl izolován subtyp HPAI H7N7 (Fouchier et al. 2004). Mezi tuleňů *Phoca vitulina* mimo jiné koluje i subtyp H10N7, který je také ptačího původu, a který způsobuje vysokou mortalitu tuleňů evropských moří (Bodewes et al. 2015; Zohari et al. 2014).

Člověk se může nakazit přímým kontaktem s nakaženou drůbeží, porážkou, škrábáním a přípravou syrového drůbežního masa, kontaktem a u dětí hraním si s drůbeží (zejména na první pohled asymptomatických, ale infikovaných kachen), spotřebou drůbeží krve nebo nedovařené drůbeže. Není ovšem rizikové jíst tepelně upravené drůbeží pokrmy, neboť je virus zničen už při teplotě 70 °C. Na člověka se přímo přenáší vysoce patogenní subtypy H5N1, H9N2 a H7N7. První přenos ptačí chřipky z drůbeže na člověka byl zaznamenán v roce 1997 v Hong Kongu (J. Liu 2005). Co se týče přenosu z člověka na člověka, existuje několik nepodložených případů (z dítěte na matku, sestřička, nakažená od pacientů ve Vietnamu), které ovšem nejsou spolehlivě potvrzeny (Beigel et al. 2005). Z prostředí je možné se nakazit z vody, jakožto přirozeným prostředím primárních hostitelů, orálním vnikem kontaminované vody při plavání.



Obrázek 4 – Hostitelé a jejich typické chřipkové kmeny. Uprostřed koloběhu chřipky v přírodě najdeme divoké vodní ptáky. Vysoce patogenní ptačí chřipky nalezneme kromě ptáků i u prasat, lidí, kočkovitých i psovitých šlem, koní, tuleňů, frettek a norků. Převzato a upraveno dle Reperant 2009

Druh	Kmen chřipky	Vážnost příznaků	Mortalita	Šíření infekce (orofaryngeální a kloakální/konečnickové výtěry)
<b>Běžci</b>				
<i>Dromaius novaehollandiae</i> <sup>1</sup>	H5N1	středně těžké	-	virus detekován v obou výtěrech
<b>Vrubozobí</b>				
<i>Aix galericulata</i> <sup>2</sup>	H5N8	mírné	žádná	vysoké titry
<i>Anas platyrhynchos</i> <sup>1</sup>	H5N1	mírné/vůbec žádné	výjimečně	vysoké titry
<i>Anser anser</i> <sup>1</sup>	H5N1	středně těžké	0-75%	středně vysoké titry
<i>Cygnus cygnus</i> <sup>3</sup>	H5N1	těžké	100%	žádné titry
<i>Cygnus olor</i> <sup>3</sup>	H5N1	těžké	100%	žádné titry
<b>Hrabaví</b>				
<i>Gallus Gallus</i> <sup>4</sup>	H5N1	velmi těžké	100%	spíše orofaryngeálně
<i>Alectoris chukar</i> <sup>4</sup>	H5N1	těžké	75%	spíše orofaryngeálně
<i>Colinus virginianus</i> <sup>4</sup>	H5N1	velmi těžké	100%	spíše orofaryngeálně
<i>Coturnix coturnix japonicus</i> <sup>4</sup>	H5N1	velmi těžké	100%	spíše orofaryngeálně
<i>Melagris gallopavo</i> <sup>4</sup>	H5N1	velmi těžké	100%	spíše orofaryngeálně
<i>Numida meleagris</i> <sup>4</sup>	H5N1	velmi těžké	100%	spíše orofaryngeálně
<i>Phasianus colchicus</i> <sup>4</sup>	H5N1	velmi těžké	100%	spíše orofaryngeálně
<b>Dlouhokřídlí</b>				
<i>Larus atricilla</i> <sup>5, 6</sup>	H5N1	žádné	0	vysoké titry
<b>Měkkozobí</b>				
<i>Columba livia</i> <sup>1, 2</sup>	H5N1	mírné/vůbec žádné	0	žádné titry
	H5N8	mírné/vůbec žádné	0	velmi vysoké titry
<b>Papoušci</b>				
<i>Melopsittacus undulatus</i> <sup>5, 7</sup>	H5N1, H7N9	těžké	75-100%	vysoké titry
<b>Pěvci</b>				
<i>Carpodacus mexicanus</i> <sup>5</sup>	H5N1	velmi mírné	do 50%	-
<i>Passer domesticus</i> <sup>8</sup>	H5N1	mírné		spíše orofaryngeálně
<i>Pica pica sericea</i> <sup>9</sup>	H5N1	velmi těžké	100%	spíše orofaryngeálně
<i>Sturnus vulgaris</i> <sup>5</sup>	H5N1	žádné	0	žádné titry
<i>Taeniopygia guttata</i> <sup>5</sup>	H5N1	těžké	100%	-
<b>Savci</b>				
<i>Canis lupus f. familiaris</i> <sup>10</sup>	H5N1	těžké	100%	spíše orofaryngeálně
<i>Equus caballus</i> <sup>11</sup>	H7N7	-	-	-
<i>Felis silvestris f. catus</i> <sup>12</sup>	H5N1	těžké	100%	nízké titry spíše orofaryngeálně
<i>Mustela putorius furo</i> <sup>11</sup>	H5N1	velmi těžké	100%	-
<i>Sus scrofa domesticus</i> <sup>11</sup>	H5N1	mírné	0	nízké titry po omezeně krátkou dobu

Tabulka 1 – tabulka udává vztah vybraných druhů ptáků a savců k umělé inokulaci HPAI v různých pracích, tedy jak vážný průběh onemocnění u daných druhů konkrétní kmen vyvolává a zda je schopen virus dále šířit orofaryngeální (tedy v podstatě kapénkově) a fekální cestou. Zdroje: (Leigh Perkins and Swayne 2002; J.-H. Kwon et al. 2017; Teifke et al. 2007; L. Perkins and Swayne 2001; Perkins and Swayne 2003; J. Liu 2005; Jones et al. 2014; Forrest, Kim, and Webster 2010; K. Y. Kwon et al. 2010; Y. Chen et al. 2010; Reperant 2009; Kuiken 2004)

### **4.3. Chřipka u ektotermních druhů**

Mezi ektotermními druhy k šíření chřipkové infekce nedochází. Existuje jen několik málo případů, kdy v krvi některých druhů žab, tropických hadů a krokodýlů, kteří se pohybují ve vodním prostředí spolu s ptáky, kteří chřipku přenášejí, byly detekovány protilátky proti chřipkovým virům, ale přímo virus nebo virový genom u nich nalezen nebyl (Reperant 2009; Davis and Spackman 2008).

## **5. Ochranná opatření související s ptačí chřipkou**

### **5.1. Léčba a prevence**

V lidské medicíně se využívají komerční antivirotika zanamivir a oseltamivir, které fungují jako inhibitory NA. Chřipkové viry tedy po zasažení těmito léčivy nemohou unikat z infikované buňky a dál se nešíří. WHO doporučuje podávat tato léčiva ve vyšších dávkách i při infekci HPAI H5N1 (Beigel et al. 2005). Podle (Leneva et al. 2000; Govorkova et al. 2001) jsou inhibitory neuraminidázy opravdu účinné proti kmenům H5N1 a H9N2 *in vitro* i na myším modelu a dokáží zabránit replikaci viru v dýchacím traktu a jeho šíření do dalších tkání těla a proto je vhodné je používat při léčbě u člověka a savců. Dalším typem antivirotik jsou inhibitory M2 iontového kanálu, čímž zabraňují splynutí virového obalu s membránou endozómu. Patří sem například amantadin a rimantidin. Přestože oseltamivir, zanamivir i amantadin působí stejným efektem jak u lidí, tak i u drůbeže a je dokázáno, že například podání oseltamiviru v pitné vodě zabraňuje systémové infekci, snižuje vážnost příznaků, mortalitu a šíření u chovaných slepic, plošná léčba antivirotiky u drůbeže se neprovádí (Abdelwhab and Hafez 2012; Meijer et al. 2004). Velkým problémem v léčbě HPAI je, že kvůli rychlým evolučním procesům bývají proti virulentnějším kmenům inhibitory neuraminidázy méně účinné a ke zneškodnění vysoce virulentní infekce je podle studie na myších potřeba podávat větší dávku léčiva po delší dobu (Yen et al. 2005). Některé nověji izolované kmeny bývají díky substituci histidinu v pozici 275 ve struktuře neuraminidázy za tyrosin dokonce plně rezistentí vůči zanamiviru i oseltamiviru a zároveň u nich bývá vyvinuta rezistence vůči inhi-

bitorům M2 kanálu (Nguyen et al. 2013). Výhodnější je proto i z hlediska prevence očkování, které je ovšem z důvodu rychlých mutačních procesů také velmi problematické. Před každou zimní chřipkovou sezónou se setkají členové WHO a pouze odhadují, proti kterým kmenům se budou daný rok vyrábět komerční vakcíny pro očkování lidské populace. Samozřejmě se může stát, že tento odhad není úplně správný anebo díky novým mutacím nemusí vakcinace poskytnout plnou ochranu. Cílem vakcinace je navodit tvorbu protilátek proti HA a NA pro rychlejší stimulaci CD8<sup>+</sup> T lymfocytů (Doherty et al. 2006). Současně se do vakcín přidávají různé adjuvanty pro vylepšení vlastností vakcín, například amantadin a rimantidin jako inhibitory funkce M2 proteinu. Nové virové kmeny ovšem bývají proti tradičně používaným metodám již rezistentní. V současné době se v humánní i veterinární medicíně používají buďto živé vakcíny obsahující jeden oslabený kmen viru, nebo vektorové vakcíny, kdy se to tělo v nějaké jiné virové částici (například v adenovirech) vpravuje chřipkový antigen (Doherty et al. 2006; Spackman and Swayne 2013; Gao et al. 2006). Takto se ovšem poskytne ochrana jen proti určitému typu chřipky a po objevení se nějakého nového kmene ochrana vymizí. Nově se tedy přechází k vývoji univerzálních chřipkových antigenů s imunostimulačním efektem, vytvořené z rekombinantních chřipkových virových proteinů, s cílem dosáhnout univerzální vakcíny proti všem chřipkovým kmenům, včetně vysoce patogenních typů (Doherty et al. 2006). Vyvíjejí se nové metody, adjuvans a přídatné látky, které by zajistili kvalitnější imunizaci proti vysoce patogenní ptačí chřipce. Zajímavá je například orální imunizace drůbeže bakteriemi rodu *Lactobacillus*, které tvoří běžnou vnitřní mikrobiotu, a které jsou geneticky upravené k produkci chřipkových antigenů (Z. Wang et al. 2013). Výzkumy jsou zaměřené také na přídatné látky do vakcín, například přidávání TLR ligandů jako adjuvans vakcín proti mnoha patogenům včetně ptačí chřipky, které pak lépe stimulují imunitní odpověď. Přidání TLR ligandu CpG ODN (cytosin fosfodiester guanin oligodeoxynukleotid) významně zvyšuje protilátkovou odpověď, zvyšuje se množství protilátek inhibujících HA a množství sérového IFN- $\gamma$ . Kromě CpG ODN mají potenciál i jiné ligandy jako například LPS a flagelin. (St. Paul et al. 2013). Mezi další moderní adjuvans s antivirovou a imunoregulační funkcí (zvýšení počtu CD8<sup>+</sup> T lymfocytů) patří protokatechuová kyselina, která v porovnání s amantadinem vytvoří kompletní ochranu proti viru ptačí chřipky (Ou et al. 2014). Kromě protokatechuové kyseliny se začínají zkoumat i další polyfenolické látky, flavonoidy a podobné sekundární rostlinné metabolity jako látky, které podporují správný chod imunitních funkcí během infekce ptačí chřipky i jiných nemocí (Talazadeh, Mayahi, and Naghavi 2016; Ou et al. 2014). Plošné očkování drůbeže proti LPAI a HPAI se nikdy neprovádělo a po proběhnutí několika vážných epidemií si jen několik málo zemí s vysokým výskytem HPAI za-

vedlo vlastní očkovací program (Čína, Indie, Vietnam, Egypt), ovšem ve většině zemích se stále neprovádí vůbec (Spackman and Pantin-Jackwood 2014; Spackman and Swayne 2013). Například v České republice se podle SVS vakcinace drůbeže proti nákaze neprovádí a v současnosti je i zakázána, protože sledování nákazy je založeno na detekci specifických protilátek ([www.svs.cz](http://www.svs.cz)). Většinou je tedy omezení šíření HPAI řešeno likvidací nakaženého ptactva. S rozvojem genetického inženýrství a vývoji nových typů vakcín, které mimo jiné mohou být podávány i orálně, by ovšem mohlo dojít k vytvoření nějakého univerzálního očkovacího programu, čímž by se povedlo snížit množství viru v prostředí a předejít jeho šíření, vysoké úmrtnosti a likvidaci ptactva a tím pádem i značným hospodářským škodám.

## 5.2. Legislativa

V České republice, jakožto členském státě Evropské unie (EU), platí legislativa EU týkající se postupů při výskytu vysoce patogenní ptačí chřipky, kterými se řídí každý členský stát. Podle prvních rozhodnutí komise během první vlny HPAI z roku 2006, konkrétně 2006/415/ES by měl každý členský stát při zjištění viru HPAI typu A podtypu H5 odebraného z drůbeže a při podezření na podtyp H5N1, zavést určitá ochranná opatření, související s pohybem drůbeže i jiného ptactva a oddělení nezasazených oblastí, vedoucí k minimalizaci rizika šíření choroby. Podle článku 4 zruší dotčený členský stát přijatá opatření, pokud se potvrdí, že typ NA je odlišný od typu 1. Takové opatření by v dnešní době již bylo zbytečné, vzhledem k tomu, že HPAI existuje několik typů s NA odlišným od typu 1. Podle rozhodnutí 2006/416/ES, článku 3 musí být v případě podezření na vznik ohniska proveden součet drůbeže a domácích zvířat spolu s počty nemocných, mrtvých a pravděpodobně infikovaných. Veškerá drůbež a jiné ptactvo chované v zajetí spolu s domácími savci jsou umístěny tak, aby nepřišly do styku s jinou drůbeží nebo jiným ptactvem a savci chovanými v zajetí z jiných hospodářství. Přijmou se také veškerá přiměřená opatření, aby byl minimalizován jejich kontakt s volně žijícími ptáky. Hospodářství nesmí opustit cokoli, co může přispět k přenosu influenzy ptáků (vejce, kadávery, maso, krmivo, nástroje, trus...). Podle článku 5 lze opatření zrušit tehdy, když je podezření na ptačí chřipku v hospodářství vyloučeno. Článek 6 říká, že může být zavedeno omezení pohybu drůbeže ve vymezené oblasti nebo v celém členském státě. Článek 7 udává opatření, která se mají použít v hospodářstvích při potvrzení vzniku ohniska. Veškerá drůbež a jiné ptactvo chované v zajetí v hospodářství jsou neprodleně usmrceny. Všechny kadávery a vejce v hospodářství se neškodným způsobem odstraní. Maso drůbeže a vejce musejí být vyhledány a také odstraněny. Po odstranění kadáverů jsou místa používaná k chovu podrobeny očištění a

dezinfekci. V případě vzniku primárního ohniska je izolát viru podroben laboratorním testům, aby mohl být určen genetický podtyp. Článek 11 udává vytvoření ochranného pásma kolem ohniska o poloměru nejméně tři kilometrů a pásmo dozoru o poloměru nejméně deseti kilometrů. V těchto oblastech se může podle článku 12 na základě epidemiologických informací nebo jiného důkazu zavést preventivní eradikační program, včetně preventivní porážky nebo usmrcení drůbeže nebo jiného ptactva chovaného v zajetí v rizikových hospodářstvích a oblastech. V ochranných pásmech je veškerá drůbež a jiné ptactvo chované v zajetí umístěna tak, aby nepřišly do styku s jinou drůbeží nebo jiným ptactvem chovaným v zajetí z jiných hospodářství, a přijmou se veškerá opatření, aby byl minimalizován jejich kontakt s volně žijícími ptáky. Opatření mohou být zrušena nejméně 21 dní po provedení předběžného vyčištění a první dezinfekci infikovaného hospodářství, a dokud nejsou v hospodářstvích nacházejících se v ochranném pásmu provedeny laboratorní testy. Od 1. 3. 2007 je v národní legislativě v účinnosti Vyhláška č. 36/2007 Sb., o opatřeních pro tlumení aviární influenzy a o změně vyhlášky č. 299/2003 Sb., o opatřeních pro předcházení a zdolávání nálezů a nemocí přenosných ze zvířat na člověka, ve znění pozdějších předpisů, která obsahuje v podstatě stejné postupy pro limitaci ptačí chřipky, jaké jsou uvedené v evropské legislativě.

V současné době platí prováděcí rozhodnutí komise 2017/247 z roku 2017, které bylo přijato během druhé vlny HPAI, a které udává zavedení ochranných pásem dozoru, která vymezí členské státy v závislosti na výskytu ohniska HPAI u drůbeže nebo ptactva chovaného v zajetí. V těchto ochranných pásmech fungují opatření definované na základě rozhodnutí komise 2017/263 z roku 2017, které vychází z dokumentu Komise pro zdraví a dobré životní podmínky zvířat s názvem „Naléhavá žádost týkající se influenzy ptáků“, v němž je potvrzeno, že ke zmírnění rizika je nejdůležitější zamezení přenosu virů HPAI podtypů H5 i H7, buď přímo, nebo nepřímo, volně žijícími ptáky do hospodářství, kde se chová drůbež a jiné ptactvo, přičemž nejúčinnější způsob, jak včas odhalit přítomnost virů HPAI u volně žijících ptáků, je pasivní dozor, odběr vzorků a laboratorní vyšetření volně žijících ptáků. Dále se odkazuje na posouzení, které provedlo Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí, v němž se uvádí, že dosud nebyl ohlášen žádný případ infekce HPAI subtypu H5N8 u lidí, a že se v podstatě stále jedná o ptačí virus. Členské státy musí v oblastech s vysokým rizikem zavést opatření s cílem zamezit tomu, aby volně žijící, zejména stěhovaví vodní ptáci, přicházeli do přímého či nepřímého kontaktu s drůbeží. Rizikové faktory pro přenos HPAI jsou: umístění hospodářství na tažných trasách ptáků, při přesunu z Asie, z oblastí Kaspického a Černého moře, Středního východu a Afriky; dále vzdálenost

hospodářství od mokrých oblastí, rybníků, močálů, jezer či řek, kde se mohou shromažďovat přirození hostitelé viru ptačí chřipky; umístění hospodářství v oblastech s vysokou hustotou stěhovavých, zejména vodních ptáků; chov drůbeže v otevřených hospodářstvích, v nichž nelze pořádně zamezit kontaktu volně žijících ptáků s drůbeží. Mezi dodatečné rizikové faktory patří umístění hospodářství v oblastech, kde je hustota hospodářství vysoká a je vysoká intenzita přesunů drůbeže, vozidel a osob v rámci hospodářství a z něj a intenzita dalších přímých či nepřímých kontaktů mezi hospodářstvími. Zavedená opatření v rizikových oblastech zahrnují zákaz chování drůbeže ve volném výběhu, používání venkovních vodních nádrží pro drůbež, podávání vody drůbeži z povrchových vodních nádrží, ke kterým mohou mít přístup volně žijící ptáci, skladování krmiva pro drůbež, které je nechráněné před volně žijícími ptáky nebo jinými zvířaty, zákaz shromažďování drůbeže a jiných ptáků chovaných v zajetí na trzích, přehlídkách, výstavách a kulturních akcích, používání volavých ptáků řádů Anseriformes a Charadriiformes. Opatření stanovená v tomto rozhodnutí by měla být použitelná až do 30. června 2018. Tyto aktuálnější uvedené postupy jsou mírnější, související s omezením pohybu ptáků, než ty zavedené během první vlny ptačí chřipky a jsou zaměřené na více subtypů, než jen na subtyp H5N1. Zajímavá je i myšlenka sledování a laboratorního vyšetření volně žijících ptáků. Takový výzkum by mohl poskytnout věcnější pohled na šíření chřipkové infekce.

## 6. Závěr

Definice ptačí chřipky je velice problematická, vzhledem k tomu, že ptáci jsou považováni za přírodní zdroj všech chřipkových subtypů. Ekologie, šíření mezi různými druhy a evoluční procesy tohoto viru jsou proto velmi zajímavá témata a měla by být podrobněji zkoumána už jen z důvodu ochrany zdraví lidí a zvířat. Díky velké mutační rychlosti je boj proti této nakaže komplikovaný. Neustále vznikají nové typy viru, s novými vlastnostmi a jinou škálou hostitelů. Jakákoliv chřipka, včetně té ptačí, je dynamický a proměnlivý patogen, což stěžuje vývoj léků a vakcín. Různé typy ptačí chřipky s vysokou patogenitou nejsou problémem jen divokých ptáků a drůbeže, ale virus se dokáže šířit i na některé savce, včetně člověka. Zdá se, že vážnost infekce je rozdílná u různých druhů. Modelovými druhy, které se využívají pro výzkum patogenity a imunitní odpovědi, jsou kachny a kuřičky domácí. Očividně zde existuje rozdíl v expresi komponentů signálních drahách vedoucí k rozdílné imunitní odpovědi a tedy k jinému průběhu onemocnění. Pravděpodobně zde má vliv exprese genu pro receptor RIG-I, který ovlivňuje mnoho imunitních dějů, a který během evoluce vymizel u linie vedoucí k hrabavým ptákům a tedy i k domácí drůbeži. K lepšímu porozumění by ovšem bylo dobré

na úrovni těchto imunitních procesů srovnat více divokých i domácích ptačích i savčích druhů a v rámci vážnosti příznaků a exprese komponentů těchto imunitních drah zjistit, jaké evolučně ekologické faktory ovlivnily přítomnost či nepřítomnost těchto genů v daných liniích. Tak by mohlo dojít ke srovnání přítomnosti těchto imunitních drah, vážnosti příznaků a šíření různých linií viru u různých druhů a poskytnout lepší informace o tom, které linie ptáků zařadit mezi potenciálně nebezpečné v přenosu ptačí chřipky. Zdá se, že žádný podrobnější výzkum na této úrovni zatím neproběhl. Existuje spousta případů náhodného pozorování nebo výzkumů určitého kmene na určitém ptačím druhu. Ve starších pracích (během a po první vlně epidemie ptačí chřipky) se například provádí experimenty výhradně s kmenem H5N1 na různých druzích ptáků i savců s cílem zjistit patogenitu a možnost šíření tohoto kmene viru na ostatní jedince. V novějších výzkumech s tím, jak se postupně objevují nové a nové vysoce patogenní linie viru, se začínají provádět experimenty i s dalšími kmeny. O tom, které linie chřipkových virů jsou ale specifické pro který druh a tím pádem, které druhy mohou být potenciální přenašeči těchto nebezpečných forem se ale i po dlouhé době neví pravděpodobně nic. Můj názor a logický závěr této práce je takový, že přirození hostitelé chřipky, kteří přežívají infekci vysoce patogenními liniemi bezpříznakově, díky dobře regulované imunitní odpovědi šíří virus ve větším množství než druhy s neadekvátní imunitní odpovědí, které rychle uhynou a nejsou tedy schopni šířit infekci po delší dobu. V tom případě by bylo vhodné zahrnout do platné legislativy očkovací a terapeutické přístupy k limitaci nákazy alespoň u domácích zvířat. S rozvojem genetického inženýrství je velkou nadějí vývoj univerzálních rekombinantních vakcín nebo vakcín, zaměřených na konzervovaný chřipkový epitop. V budoucnu by tedy mohl vzniknout univerzální očkovací program pro lidi i zvířata. Prozatím alespoň nouzové očkování během vypuknutí epidemie a zabránit tak eradikaci drůbeže a domácího ptactva a tedy značným hospodářským škodám, později i preventivní očkování, čímž by se mohlo limitovat šíření tohoto viru v prostředí.

## 7. Použitá literatura

- Abdelwhab, E., and Hafez Hafez. 2012. 'Insight into Alternative Approaches for Control of Avian Influenza in Poultry, with Emphasis on Highly Pathogenic H5N1'. *Viruses* 4 (11): 3179–3208. <https://doi.org/10.3390/v4113179>.
- Barber, Megan, J. R. Aldridge, R. G. Webster, and K. E. Magor. 2010. 'Association of RIG-I with Innate Immunity of Ducks to Influenza'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (13): 5913–18. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001755107>.
- Barber, Megan, Jerry R. Aldridge, Ximena Fleming-Canepa, Yong-Dong Wang, Robert G. Webster, and Katharine E. Magor. 2013. 'Identification of Avian RIG-I Responsive Genes during Influenza Infection'. *Molecular Immunology* 54 (1): 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.10.038>.
- Beigel, John H., Jeremy Farrar, Aye Maung Han, Frederick G. Hayden, Randy Hyer, Menno D. de Jong, So-rasak Lochindarat, et al. 2005. 'Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans'. *The New England Journal of Medicine* 353 (13): 1374–85. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052211>.

- Bodewes, Rogier, Theo M. Bestebroer, Erhard van der Vries, Josanne H. Verhagen, Sander Herfst, Marion P. Koopmans, Ron A.M. Fouchier, et al. 2015. 'Avian Influenza A(H10N7) Virus-Associated Mass Deaths among Harbor Seals'. *Emerging Infectious Diseases* 21 (4): 720–22. <https://doi.org/10.3201/eid2104.141675>.
- Boseret, Geraldine, Bertrand Losson, Jacques G Mainil, Etienne Thiry, and Claude Saegerman. 2013. 'Zoonoses in Pet Birds: Review and Perspectives'. *Veterinary Research* 44 (1): 36. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-36>.
- Bruce, E. A., T. E. Abbink, H. M. Wise, R. Rollason, R. P. Galao, G. Banting, S. J. Neil, and P. Digard. 2012. 'Release of Filamentous and Spherical Influenza A Virus Is Not Restricted by Tetherin'. *Journal of General Virology* 93 (Pt\_5): 963–69. <https://doi.org/10.1099/vir.0.038778-0>.
- Calvo, Cristina, M Luz García-García, Belen Borrell, Francisco Pozo, and Inmaculada Casas. 2013. 'Prospective Study of Influenza C in Hospitalized Children'. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, April, 1. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31828fca10>.
- Chen, Liang-Jun, Xian-Dan Lin, Jun-Hua Tian, Yong Liao, Xu-Hua Ying, Jian-Wei Shao, Bin Yu, et al. 2017. 'Diversity, Evolution and Population Dynamics of Avian Influenza Viruses Circulating in the Live Poultry Markets in China'. *Virology* 505 (May): 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.02.009>.
- Chen, Liang-Jun, Bin Yu, Xian-Dan Lin, Zhan-Qiu Yang, Wen-Ping Guo, Mang Shi, Jun-Hua Tian, et al. 2016. 'Diversity and Evolution of Avian Influenza Viruses in Live Poultry Markets, Free-Range Poultry and Wild Wetland Birds in China'. *Journal of General Virology* 97 (4): 844–54. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000399>.
- Chen, Ying, Gongxun Zhong, Guojun Wang, Guohua Deng, Yanbing Li, Jianzhong Shi, Zhuo Zhang, et al. 2010. 'Dogs Are Highly Susceptible to H5N1 Avian Influenza Virus'. *Virology* 405 (1): 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.024>.
- Cornelissen, J. B. W. J., L. Vervelde, J. Post, and J. M. J. Rebel. 2013. 'Differences in Highly Pathogenic Avian Influenza Viral Pathogenesis and Associated Early Inflammatory Response in Chickens and Ducks'. *Avian Pathology* 42 (4): 347–64. <https://doi.org/10.1080/03079457.2013.807325>.
- Crawford, P. C. 2005. 'Transmission of Equine Influenza Virus to Dogs'. *Science* 310 (5747): 482–85. <https://doi.org/10.1126/science.1117950>.
- Davis, Lisa Marie, and Erica Spackman. 2008. 'Do Crocodylians Get the Flu? Looking for Influenza A in Captive Crocodylians'. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 309A (10): 571–80. <https://doi.org/10.1002/jez.454>.
- Dejong, M, and T Hien. 2006. 'Avian Influenza A (H5N1)'. *Journal of Clinical Virology* 35 (1): 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.09.002>.
- Diamond, Michael S., and Michael Farzan. 2013. 'The Broad-Spectrum Antiviral Functions of IFIT and IFITM Proteins'. *Nature Reviews Immunology* 13 (1): 46–57. <https://doi.org/10.1038/nri3344>.
- Diebold, S. S. 2004. 'Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA'. *Science* 303 (5663): 1529–31. <https://doi.org/10.1126/science.1093616>.
- Doherty, Peter C, Stephen J Turner, Richard G Webby, and Paul G Thomas. 2006. 'Influenza and the Challenge for Immunology'. *Nature Immunology* 7 (5): 449–55. <https://doi.org/10.1038/ni1343>.
- Forrest, H. L., J.-K. Kim, and R. G. Webster. 2010. 'Virus Shedding and Potential for Interspecies Waterborne Transmission of Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus in Sparrows and Chickens'. *Journal of Virology* 84 (7): 3718–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02017-09>.
- Fouchier, R. A. M., P. M. Schneeberger, F. W. Rozendaal, J. M. Broekman, S. A. G. Kemink, V. Munster, T. Kuiken, et al. 2004. 'Avian Influenza A Virus (H7N7) Associated with Human Conjunctivitis and a Fatal Case of Acute Respiratory Distress Syndrome'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (5): 1356–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308352100>.
- Gao, W., A. C. Soloff, X. Lu, A. Montecalvo, D. C. Nguyen, Y. Matsuoka, P. D. Robbins, et al. 2006. 'Protection of Mice and Poultry from Lethal H5N1 Avian Influenza Virus through Adenovirus-Based Immunization'. *Journal of Virology* 80 (4): 1959–64. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.4.1959-1964.2006>.
- Gnirß, Kerstin, Pawel Zmora, Paulina Blazejewska, Michael Winkler, Anika Lins, Inga Nehlmeier, Sabine Gärtner, et al. 2015. 'Tetherin Sensitivity of Influenza A Viruses Is Strain Specific: Role of Hemagglutinin and Neuraminidase'. Edited by D. S. Lyles. *Journal of Virology* 89 (18): 9178–88. <https://doi.org/10.1128/JVI.00615-15>.
- Govorkova, E. A., I. A. Leneva, O. G. Goloubeva, K. Bush, and R. G. Webster. 2001. 'Comparison of Efficacies of RWJ-270201, Zanamivir, and Oseltamivir against H5N1, H9N2, and Other Avian Influenza Viruses'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (10): 2723–32. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.10.2723-2732.2001>.
- Graham, Andrea L., Judith E. Allen, and Andrew F. Read. 2005. 'Evolutionary Causes and Consequences of Immunopathology'. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36 (1): 373–97. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152622>.

- Hamilton, Brian S., Gary R. Whittaker, and Susan Daniel. 2012. 'Influenza Virus-Mediated Membrane Fusion: Determinants of Hemagglutinin Fusogenic Activity and Experimental Approaches for Assessing Virus Fusion'. *Viruses* 4 (12): 1144–68. <https://doi.org/10.3390/v4071144>.
- Hasselquist, D., A. Lindstrom, S. Jenni-Eiermann, A. Koolhaas, and T. Piersma. 2007. 'Long Flights Do Not Influence Immune Responses of a Long-Distance Migrant Bird: A Wind-Tunnel Experiment'. *Journal of Experimental Biology* 210 (7): 1123–31. <https://doi.org/10.1242/jeb.02712>.
- He, C.-Q., Z.-X. Xie, G.-Z. Han, J.-B. Dong, D. Wang, J.-B. Liu, L.-Y. Ma, et al. 2008. 'Homologous Recombination as an Evolutionary Force in the Avian Influenza A Virus'. *Molecular Biology and Evolution* 26 (1): 177–87. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn238>.
- He, Xiao-Song, Monia Draghi, Kutubuddin Mahmood, Tyson H. Holmes, George W. Kemble, Cornelia L. Dekker, Ann M. Arvin, Peter Parham, and Harry B. Greenberg. 2004. 'T Cell-dependent Production of IFN- $\gamma$  by NK Cells in Response to Influenza A Virus'. *Journal of Clinical Investigation* 114 (12): 1812–19. <https://doi.org/10.1172/JCI200422797>.
- Ito, T., J. N. Couceiro, S. Kelm, L. G. Baum, S. Krauss, M. R. Castrucci, I. Donatelli, et al. 1998. 'Molecular Basis for the Generation in Pigs of Influenza A Viruses with Pandemic Potential'. *Journal of Virology* 72 (9): 7367–73.
- Jones, Jeremy C., Stephanie Sonnberg, Zeynep A. Koçer, Karthik Shanmuganatham, Patrick Seiler, Yuelong Shu, Huachen Zhu, et al. 2014. 'Possible Role of Songbirds and Parakeets in Transmission of Influenza A(H7N9) Virus to Humans'. *Emerging Infectious Diseases* 20 (3). <https://doi.org/10.3201/eid2003.131271>.
- Keawcharoen, Juthatip, Kanisak Oraveerakul, Thijs Kuiken, Ron A.M. Fouchier, Alongkorn Amonsin, Sunchai Payungporn, Suwanna Noppornpanth, et al. 2004. 'Avian Influenza H5N1 in Tigers and Leopards'. *Emerging Infectious Diseases* 10 (12): 2189–91. <https://doi.org/10.3201/eid1012.040759>.
- Kreijtz, J. H. C. M., G. de Mutsert, C. A. van Baalen, R. A. M. Fouchier, A. D. M. E. Osterhaus, and G. F. Rimmelzwaan. 2008. 'Cross-Recognition of Avian H5N1 Influenza Virus by Human Cytotoxic T-Lymphocyte Populations Directed to Human Influenza A Virus'. *Journal of Virology* 82 (11): 5161–66. <https://doi.org/10.1128/JVI.02694-07>.
- Kuchipudi, Suresh V, Meenu Tellabati, Sujith Sebastian, Brandon Z Londt, Christine Jansen, Lonkeke Vervelde, Sharon M Brookes, Ian H Brown, Stephen P Dunham, and Kin-Chow Chang. 2014. 'Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Infection in Chickens but Not Ducks Is Associated with Elevated Host Immune and pro-Inflammatory Responses'. *Veterinary Research* 45 (1). <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0118-3>.
- Kuiken, T. 2004. 'Avian H5N1 Influenza in Cats'. *Science* 306 (5694): 241–241. <https://doi.org/10.1126/science.1102287>.
- Kuiken, T., G. F. Rimmelzwaan, G. Van Amerongen, and A. D. M. E. Osterhaus. 2003. 'Pathology of Human Influenza A (H5N1) Virus Infection in Cynomolgus Macaques ( *Macaca Fascicularis* )'. *Veterinary Pathology* 40 (3): 304–10. <https://doi.org/10.1354/vp.40-3-304>.
- Kwon, Jung-Hoon, Yun Kyung Noh, Dong-Hun Lee, Seong-Su Yuk, Tseren-Ochir Erdene-Ochir, Jin-Yong Noh, Woo-Tack Hong, et al. 2017. 'Experimental Infection with Highly Pathogenic H5N8 Avian Influenza Viruses in the Mandarin Duck ( *Aix Galericulata* ) and Domestic Pigeon ( *Columba Livia Domestica* )'. *Veterinary Microbiology* 203 (May): 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.003>.
- Kwon, K. Y., S. J. Joh, M. C. Kim, M. S. Kang, Y. J. Lee, J. H. Kwon, and J. H. Kim. 2010. 'The Susceptibility of Magpies to a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Subtype H5N1'. *Poultry Science* 89 (6): 1156–61. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00549>.
- L. Perkins, L. E., and D. E. Swayne. 2001. 'Pathobiology of A/Chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) Avian Influenza Virus in Seven Gallinaceous Species'. *Veterinary Pathology* 38 (2): 149–64. <https://doi.org/10.1354/vp.38-2-149>.
- Leigh Perkins, Laura E., and David E. Swayne. 2002. 'Pathogenicity of a Hong Kong-Origin H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus for Emus, Geese, Ducks, and Pigeons'. *Avian Diseases* 46 (1): 53–63. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0053:POAHKO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0053:POAHKO]2.0.CO;2).
- Leneva, I. A., N. Roberts, E. A. Govorkova, O. G. Goloubeva, and R. G. Webster. 2000. 'The Neuraminidase Inhibitor GS4104 (Oseltamivir Phosphate) Is Efficacious against A/Hong Kong/156/97 (H5N1) and A/Hong Kong/1074/99 (H9N2) Influenza Viruses'. *Antiviral Research* 48 (2): 101–15.
- Leschnik, Michael, Joachim Weikel, Karin Möstl, Sandra Revilla-Fernández, Eveline Wodak, Zoltan Bagó, Elisabeth Vanek, Viviane Benetka, Michael Hess, and Johann G. Thalhammer. 2007. 'Subclinical Infection with Avian Influenza A H5N1 Virus in Cats'. *Emerging Infectious Diseases* 13 (2): 243–47. <https://doi.org/10.3201/eid1302.060608>.
- Lin, D., S. Sun, L. Du, J. Ma, L. Fan, J. Pu, Y. Sun, J. Zhao, H. Sun, and J. Liu. 2012. 'Natural and Experimental Infection of Dogs with Pandemic H1N1/2009 Influenza Virus'. *Journal of General Virology* 93 (1): 119–23. <https://doi.org/10.1099/vir.0.037358-0>.

- Lipatov, Aleksandr S., Yong Kuk Kwon, Luciana V. Sarmiento, Kelly M. Lager, Erica Spackman, David L. Suarez, and David E. Swayne. 2008. 'Domestic Pigs Have Low Susceptibility to H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses'. Edited by Richard J. Webby. *PLoS Pathogens* 4 (7): e1000102. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000102>.
- Liu, J. 2005. 'Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus Infection in Migratory Birds'. *Science* 309 (5738): 1206–1206. <https://doi.org/10.1126/science.1115273>.
- Liu, Xiaoling, Zhendong Zhao, and Wenjun Liu. 2013. 'Insights into the Roles of Cyclophilin A During Influenza Virus Infection'. *Viruses* 5 (12): 182–91. <https://doi.org/10.3390/v5010182>.
- Liu, Yuehuan, Jiao Zhou, Hanchun Yang, Weiguang Yao, Weidong Bu, Bing Yang, Weiping Song, et al. 2007. 'Susceptibility and Transmissibility of Pigeons to Asian Lineage Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Subtype H5N1'. *Avian Pathology* 36 (6): 461–65. <https://doi.org/10.1080/03079450701639335>.
- Lund, J. M., L. Alexopoulou, A. Sato, M. Karow, N. C. Adams, N. W. Gale, A. Iwasaki, and R. A. Flavell. 2004. 'Recognition of Single-Stranded RNA Viruses by Toll-like Receptor 7'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (15): 5598–5603. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400937101>.
- Lyon, Jennifer A., and Virginia S. Hinshaw. 1993. 'Inhibition of Nitric Oxide Induction from Avian Macrophage Cell Lines by Influenza Virus'. *Avian Diseases* 37 (3): 868. <https://doi.org/10.2307/1592043>.
- Maines, Taronna R., Kristy J. Szretter, Lucy Perrone, Jessica A. Belser, Rick A. Bright, Hui Zeng, Terrence M. Tumpey, and Jacqueline M. Katz. 2008. 'Pathogenesis of Emerging Avian Influenza Viruses in Mammals and the Host Innate Immune Response'. *Immunological Reviews* 225 (1): 68–84. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00690.x>.
- Martcheva, Maia. 2012. 'An Evolutionary Model of Influenza A with Drift and Shift'. *Journal of Biological Dynamics* 6 (2): 299–332. <https://doi.org/10.1080/17513758.2011.573866>.
- Mase, M., T. Imada, Y. Sanada, M. Etoh, N. Sanada, K. Tsukamoto, Y. Kawaoka, and S. Yamaguchi. 2001. 'Imported Parakeets Harbor H9N2 Influenza A Viruses That Are Genetically Closely Related to Those Transmitted to Humans in Hong Kong'. *Journal of Virology* 75 (7): 3490–94. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.7.3490-3494.2001>.
- Meijer, Adam, Jeanet A van der Goot, Guus Koch, Michiel van Boven, and Tjeerd G Kimman. 2004. 'Oseltamivir Reduces Transmission, Morbidity, and Mortality of Highly Pathogenic Avian Influenza in Chickens'. *International Congress Series* 1263 (June): 495–98. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2004.01.020>.
- Mo, I. P., M. Brugh, O. J. Fletcher, G. N. Rowland, and D. E. Swayne. 1997. 'Comparative Pathology of Chickens Experimentally Inoculated with Avian Influenza Viruses of Low and High Pathogenicity'. *Avian Diseases* 41 (1): 125. <https://doi.org/10.2307/1592452>.
- Møller, Anders Pape, and Johannes Erritzøe. 1998. 'Host Immune Defence and Migration in Birds'. *Evolutionary Ecology* 12 (8): 945–53. <https://doi.org/10.1023/A:1006516222343>.
- Muzyka, Denys, Hyun Lillehoj, Olexandr Rula, and Borys Stegnyy. 2017. 'Immune Response and Distribution of Antigen in Chickens after Infection LPAIV (H4N6)'. *Online Journal of Public Health Informatics* 9 (1). <https://doi.org/10.5210/ojphi.v9i1.7690>.
- Nagy, Alexander, Jirina Machova, Jitka Hornickova, Miroslav Tomci, Ivan Nagl, Bedrich Horyna, and Ivan Holko. 2007. 'Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Subtype H5N1 in Mute Swans in the Czech Republic'. *Veterinary Microbiology* 120 (1–2): 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.10.004>.
- Nguyen, Ha T., Tung Nguyen, Vasily P. Mishin, Katrina Sleeman, Amanda Balish, Joyce Jones, Adrian Creanga, et al. 2013. 'Antiviral Susceptibility of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Viruses Isolated from Poultry, Vietnam, 2009–2011'. *Emerging Infectious Diseases* 19 (12): 1963–71. <https://doi.org/10.3201/eid1912.130705>.
- Olsen, B., V. J. Munster, A. Wallensten, J. Waldenstrom, A. D. M. E. Osterhaus, and R. A. M. Fouchier. 2006. 'Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds'. *Science* 312 (5772): 384–88. <https://doi.org/10.1126/science.1122438>.
- Osterhaus, A. D., G. F. Rimmelzwaan, B. E. Martina, T. M. Bestebroer, and R. A. Fouchier. 2000. 'Influenza B Virus in Seals'. *Science (New York, N.Y.)* 288 (5468): 1051–53.
- Ou, Changbo, Ningning Shi, Qunhui Yang, Yu Zhang, Zongxue Wu, Baozhong Wang, Richard W. Compans, and Cheng He. 2014. 'Protocatechuic Acid, a Novel Active Substance against Avian Influenza Virus H9N2 Infection'. Edited by Meijia Zhang. *PLoS ONE* 9 (10): e111004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111004>.
- Penczykowski, Rachel M., Anna-Liisa Laine, and Britt Koskella. 2016. 'Understanding the Ecology and Evolution of Host-Parasite Interactions across Scales'. *Evolutionary Applications* 9 (1): 37–52. <https://doi.org/10.1111/eva.12294>.
- Perkins, L. E. L., and D. E. Swayne. 2003. 'Comparative Susceptibility of Selected Avian and Mammalian Species to a Hong Kong-Origin H5N1 High-Pathogenicity Avian Influenza Virus'. *Avian Diseases* 47 (s3): 956–67. <https://doi.org/10.1637/0005-2086-47.s3.956>.

- Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, T. I. Naslund, P. Liljestrom, F. Weber, and C. Reis e Sousa. 2006. 'RIG-I-Mediated Antiviral Responses to Single-Stranded RNA Bearing 5'-Phosphates'. *Science* 314 (5801): 997–1001. <https://doi.org/10.1126/science.1132998>.
- Reperant, L.A. 2009. 'Avian Influenza Viruses in Mammals: -EN- Avian Influenza Viruses in Mammals -FR- Les Virus de L'influenza Aviaire et Les Mammifères -ES- Virus Dela Influenza Aviar En Mamíferos'. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* 28 (1): 137–59. <https://doi.org/10.20506/rst.28.1.1876>.
- Rimmelzwaan, G. F., T. Kuiken, G. van Amerongen, T. M. Bestebroer, R. A. M. Fouchier, and A. D. M. E. Osterhaus. 2001. 'Pathogenesis of Influenza A (H5N1) Virus Infection in a Primate Model'. *Journal of Virology* 75 (14): 6687–91. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6687-6691.2001>.
- Rimmelzwaan, Guus F., Debby van Riel, Marianne Baars, Theo M. Bestebroer, Geert van Amerongen, Ron A.M. Fouchier, Albert D.M.E. Osterhaus, and Thijs Kuiken. 2006. 'Influenza A Virus (H5N1) Infection in Cats Causes Systemic Disease with Potential Novel Routes of Virus Spread within and between Hosts'. *The American Journal of Pathology* 168 (1): 176–83. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050466>.
- Schmid-Hempel, Paul. 2011. *Evolutionary Parasitology: The Integrated Study of Infections, Immunology, Ecology, and Genetics*. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Sims, L. D., J. Domenech, C. Benigno, S. Kahn, A. Kamata, J. Lubroth, V. Martin, and P. Roeder. 2005. 'Origin and Evolution of Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza in Asia'. *Veterinary Record* 157 (6): 159–64. <https://doi.org/10.1136/vr.157.6.159>.
- Smith, Jacqueline, Nikki Smith, Le Yu, Ian R. Paton, Maria Weronika Gutowska, Heather L. Forrest, Angela F. Danner, et al. 2015. 'A Comparative Analysis of Host Responses to Avian Influenza Infection in Ducks and Chickens Highlights a Role for the Interferon-Induced Transmembrane Proteins in Viral Resistance'. *BMC Genomics* 16 (1). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1778-8>.
- Song, Daesub, Bokyu Kang, Chulseung Lee, Kwonil Jung, Gunwoo Ha, Dongseok Kang, Seongjun Park, Bongkyun Park, and Jinsik Oh. 2008. 'Transmission of Avian Influenza Virus (H3N2) to Dogs'. *Emerging Infectious Diseases* 14 (5): 741–46. <https://doi.org/10.3201/eid1405.071471>.
- Song, Daesub, Chulseung Lee, Bokyu Kang, Kwonil Jung, Taehoon Oh, Hyekwon Kim, Bongkyun Park, and Jinsik Oh. 2009. 'Experimental Infection of Dogs with Avian-Origin Canine Influenza A Virus (H3N2)'. *Emerging Infectious Diseases* 15 (1): 56–58. <https://doi.org/10.3201/eid1501.080755>.
- Songserm, Thaweesak, Alongkorn Amonsin, Rungroj Jam-on, Namdee Sae-Heng, Noppadol Meemak, Nuana-nong Pariyothorn, Sunchai Payungporn, Apiradee Theamboonlers, and Yong Poovorawan. 2006. 'Avian Influenza H5N1 in Naturally Infected Domestic Cat'. *Emerging Infectious Diseases* 12 (4): 681–83. <https://doi.org/10.3201/eid1204.051396>.
- Songserm, Thaweesak, Alongkorn Amonsin, Rungroj Jam-on, Namdee Sae-Heng, Nuana-nong Pariyothorn, Sunchai Payungporn, Apiradee Theamboonlers, Salin Chutinimitkul, Roongroje Thanawongnuwech, and Yong Poovorawan. 2006. 'Fatal Avian Influenza A H5N1 in a Dog'. *Emerging Infectious Diseases* 12 (11): 1744–47. <https://doi.org/10.3201/eid1211.060542>.
- Spackman, Erica, and Mary J. Pantin-Jackwood. 2014. 'Practical Aspects of Vaccination of Poultry against Avian Influenza Virus'. *The Veterinary Journal* 202 (3): 408–15. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.017>.
- Spackman, Erica, and David E. Swayne. 2013. 'Vaccination of Gallinaceous Poultry for H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza: Current Questions and New Technology'. *Virus Research* 178 (1): 121–32. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.03.004>.
- St. Paul, Michael, Jennifer T. Brisbin, Mohamed Faizal Abdul-Careem, and Shayan Sharif. 2013. 'Immunostimulatory Properties of Toll-like Receptor Ligands in Chickens'. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 152 (3–4): 191–99. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.10.013>.
- Suarez, D. L., and S. Schultz-Cherry. 2000. 'Immunology of Avian Influenza Virus: A Review'. *Developmental and Comparative Immunology* 24 (2–3): 269–83.
- Talazadeh, Forough, Mansoor Mayahi, and Marziye Naghavi. 2016. 'The Effect of Antibiofin® on the Immune Response Against Avian Influenza Subtype H9N2 Vaccine in Broiler Chickens'. *International Journal of Enteric Pathogens* 4 (3): 4–39396. <https://doi.org/10.15171/ijep.2016.04>.
- Teifke, J. P., R. Klopfleisch, A. Globig, E. Starick, B. Hoffmann, P. U. Wolf, M. Beer, T. C. Mettenleiter, and T. C. Harder. 2007. 'Pathology of Natural Infections by H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus in Mute ( *Cygnus Olor* ) and Whooper ( *Cygnus Cygnus* ) Swans'. *Veterinary Pathology* 44 (2): 137–43. <https://doi.org/10.1354/vp.44-2-137>.
- Thanawongnuwech, Roongroje, Alongkorn Amonsin, Rachod Tantilertcharoen, Sudarat Damrongwatanapokin, Apiradee Theamboonlers, Sunchai Payungporn, Kamonchart Nanthapornphiphat, et al. 2005. 'Probable Tiger-to-Tiger Transmission of Avian Influenza H5N1'. *Emerging Infectious Diseases* 11 (5): 699–701. <https://doi.org/10.3201/eid1105.050007>.

- Tumpey, T. M., X. Lu, T. Morken, S. R. Zaki, and J. M. Katz. 2000. 'Depletion of Lymphocytes and Diminished Cytokine Production in Mice Infected with a Highly Virulent Influenza A (H5N1) Virus Isolated from Humans'. *Journal of Virology* 74 (13): 6105–16. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.13.6105-6116.2000>.
- Vajda, Judith, Dennis Weber, Dominik Brekel, Boris Hundt, and Egbert Müller. 2016. 'Size Distribution Analysis of Influenza Virus Particles Using Size Exclusion Chromatography'. *Journal of Chromatography A* 1465 (September): 117–25. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.056>.
- Wang, Z., Q. Yu, J. Fu, J. Liang, and Q. Yang. 2013. 'Immune Responses of Chickens Inoculated with Recombinant *Lactobacillus* Expressing the Haemagglutinin of the Avian Influenza Virus'. *Journal of Applied Microbiology* 115 (6): 1269–77. <https://doi.org/10.1111/jam.12325>.
- Wang, Zhongfang, Liyen Loh, Lukasz Kedzierski, and Katherine Kedzierska. 2016. 'Avian Influenza Viruses, Inflammation, and CD8+ T Cell Immunity'. *Frontiers in Immunology* 7 (March). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00060>.
- Weber, Thomas P., and Nikolaos I. Stilianakis. 2007. 'Ecologic Immunology of Avian Influenza (H5N1) in Migratory Birds'. *Emerging Infectious Diseases* 13 (8): 1139–43. <https://doi.org/10.3201/eid1308.070319>.
- Wei, Liangmeng, Peirong Jiao, Runyu Yuan, Yafen Song, Pengfei Cui, Xuchen Guo, Bofang Zheng, et al. 2013. 'Goose Toll-like Receptor 7 (TLR7), Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88) and Antiviral Molecules Involved in Anti-H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Response'. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 153 (1–2): 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.02.012>.
- WHO. 1980. 'A Revision of the System of Nomenclature for Influenza Viruses: A WHO Memorandum'. *Bulletin of the World Health Organization* 58 (4): 585–91.
- The WHO Global Influenza Program Surveillance Network. 2005. 'Evolution of H5N1 Avian Influenza Viruses in Asia'. *Emerging Infectious Diseases* 11 (10): 1515–26. <https://doi.org/10.3201/eid1110.050644>.
- WHO, and Expert Committee on Influenza. 1953. *Expert Committee on Influenza: First Report [of a Meeting Held in Geneva from 8 to 12 September 1952]*. Geneva: World Health Organization.
- Wilkins, Courtney, and Michael Gale. 2010. 'Recognition of Viruses by Cytoplasmic Sensors'. *Current Opinion in Immunology* 22 (1): 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.12.003>.
- Wu, Ying, Yan Wu, Boris Tefsen, Yi Shi, and George F. Gao. 2014. 'Bat-Derived Influenza-like Viruses H17N10 and H18N11'. *Trends in Microbiology* 22 (4): 183–91. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.010>.
- Yen, Hui-Ling, Arnold S. Monto, Robert G. Webster, and Elena A. Govorkova. 2005. 'Virulence May Determine the Necessary Duration and Dosage of Oseltamivir Treatment for Highly Pathogenic A/Vietnam/1203/04 Influenza Virus in Mice'. *The Journal of Infectious Diseases* 192 (4): 665–72. <https://doi.org/10.1086/432008>.
- Yoneyama, Mitsutoshi, and Takashi Fujita. 2009. 'RNA Recognition and Signal Transduction by RIG-I-like Receptors'. *Immunological Reviews* 227 (1): 54–65. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00727.x>.
- Zeng, H., C. Goldsmith, P. Thawatsupha, M. Chittaganpitch, S. Waicharoen, S. Zaki, T. M. Tumpey, and J. M. Katz. 2007. 'Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Viruses Elicit an Attenuated Type I Interferon Response in Polarized Human Bronchial Epithelial Cells'. *Journal of Virology* 81 (22): 12439–49. <https://doi.org/10.1128/JVI.01134-07>.
- Zitzow, L. A., T. Rowe, T. Morken, W.-J. Shieh, S. Zaki, and J. M. Katz. 2002. 'Pathogenesis of Avian Influenza A (H5N1) Viruses in Ferrets'. *Journal of Virology* 76 (9): 4420–29. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.9.4420-4429.2002>.
- Zohari, S, A Neimanis, T Härkönen, C Moraeus, and J F Valarcher. 2014. 'Avian Influenza A(H10N7) Virus Involvement in Mass Mortality of Harbour Seals (*Phoca vitulina*) in Sweden, March through October 2014'. *Eurosurveillance* 19 (46). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.46.20967>.

Webové zdroje:

Státní veterinární správa [online]. [cit. 2018-04-03]. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/ptaci-chripka-influenza-drubeze/>

Legislativa:

Rozhodnutí komise 2006/415/ES o některých ochranných opatřeních týkajících se vysoce patogenní chřipky podtypu H5N1 u drůbeže ve Společenství a o zrušení rozhodnutí 2006/135/ES

Rozhodnutí komise 2006/416/ES o některých přechodných opatřeních týkajících se vysoce patogenní influenzy ptáků u drůbeže a jiného ptactva chovaného v zajetí ve Společenství

Prováděcí rozhodnutí komise (EU) 2017/247 o ochranných opatřeních v souvislosti s ohnisky vysoce patogenní influenzy ptáků v určitých členských státech

Prováděcí rozhodnutí komise (EU) 2017/263 o opatřeních ke zmírnění rizika, posílených opatřeních biologické bezpečnosti a systémech včasného odhalení v souvislosti s riziky, která představují volně žijící ptáci pro přenos virů vysoce patogenní influenzy ptáků na drůbež