

Usporedba pandemijskog virusa A/H1N1/ iz 1918. godine s potencijalnim pandemijskim virusom A/H5N1/ iz 2005. godine

Vladimir DRAŽENVIĆ, dr. med.,
specijalist mikrobiolog
Andreja BARIŠIN, dr. med.,
specijalist epidemiolog

Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb

Stručni članak

Jedna od tri velike pandemije 20. stoljeća je najveća epidemija svih vremena tzv. Španjolska gripa uzrokovana virusom tipa A/H1N1/, a 1918. godine usmrtila je oko 50 milijuna ljudi. Razlog tako velikog broja žrtava virusolozi nisu sa sigurnošću mogli odgonetnuti do u nazad par mjeseci. Na temelju zaostalog obdukcijanskog materijala iz davne 1918. uspjelo je ponovno oživjeti pojedine komponente virusa i tako pojasniti nedoumice u vezi sa molekularnom osnovom patogenosti. Isto tako znanstvenici u cijelom svijetu intenzivno se bave ispitivanjem molekularne strukture virusa gripe A/H5N1/ koji bi, smatra se, mogao biti uzročnikom slijedeće pandemije humane influence. U ovom pregledu pokušati ćemo usporediti osnovne karakteristike oba virusa i pokušati odgovoriti na pitanje koliko su oni slični, a koliko različiti. Osnovna razlika između ova dva virusa je za sada to što se virus A/H5N1/ ne prenosi s čovjeka na čovjeka, nego je to bolest ptica, uglavnom zbog toga što se taj virus kod oboljelih ljudi luči u izuzetno niskim količinama. Ono što zabrinjava je izuzetno visoki letalitet kod laboratorijskih životinja jednog i drugog virusa koji do sad nije zabilježen kod poznatih tipova virusa influence. Isto tako brojne mutacije u samo par godina virusa A/H5N1/ dovele su do također većeg letaliteta brojnih životinjskih vrsta i poboljšale mogućnosti preživljavanja u vanjskoj sredini.

Comparison of pandemic virus A/H1N1/ from 1918 with potential pandemic virus A/H5N1/ from year 2005

Professional paper

One of three major pandemics of the 20th century is the greatest epidemic of all times, the so called Spanish flu, caused by the virus type A/H1N1/, which in 1918 caused the death of around 50 million people. Virologists could not explain with certainty the reason for such high number of deaths until a couple of months ago. Based on remnants of autopsy material from the long gone 1918 it was possible to revive certain components of the virus and therefore explain some uncertainties regarding the molecular base for such pathogenity. Scientists all around the world have also been conducting research into the molecular structure of the flu virus A/H5N1/ which, it is considered, could be the cause of the next pandemic of human influenza. In this overview we will try to compare the basic characteristics of both viruses and try to answer the question how much alike they are, and in what way do they differ. The main difference between the two viruses is that for the time being, the A/H5N1/ is not transferred from human to human, but remains an illness of the birds, mostly due to the fact that this virus shows extremely low secretion with people suffering from this illness. What is disturbing, is an extremely high lethality level with laboratory animals from both viruses, a level not yet registered with any known type of influenza virus. Equally numerous mutations of the virus A/H5N1/ have also led to an increased lethality of numerous animal species and have increased survival possibilities in open surroundings.

Ključne riječi

hemagglutinin
influenca
ptičja gripa

Key words

hemagglutinin
influenza
avian flu

Primljeno: 2006-01-26

Received: 2006-01-26

Prihvaćeno: 2006-02-16

Accepted: 2006-02-16

Uvod

Gripa – povijesni osvrt. Prvi se put bolest slična gripi spominje 500. godine prije Krista u Grčkoj.

1170. godine je zabilježena u Engleskoj, a 1358. u Italiji kada dobiva ime Influenca. Ime je dobila od talijanskog naziva za tu bolest »influenza di fredo« što bi značilo

utjecaj hladnoće, jer se u pravilu javljala u najhladnijem mjesecu u godini.

Prema nekim podacima, i na brodu »Isabela 2« glaso- vitog moreplovca Kristofora Kolumba 1493. godine navodno se pojavila influenza.

Kod nas se udomaćio naziv gripa jer smo riječ preuzeli od francuskog »gripper«, što znači zgrabiti, ščepati, a upravo je to i najbolji opis kako započinje sama bolest – naglo.

Prve se pandemije, obolijevanja u cijelom svijetu u istoj sezoni bilježe 1580. godine u Aziji a više od stoljeća poslije 1700. u Europi. Jedna od tri velike pandemije 20. stoljeća je najveća epidemija svih vremena tzv. Španjolska gripa uzrokovana virusom tipa A/H1N1/, a 1918. godine usmrtila je oko 50 milijuna ljudi. Razlog tako velikog broja žrtava virusolozi nisu sa sigurnošću mogli odgonetnuti do u nazad par mjeseci. Na temelju zaostalog obdukcijskog materijala iz davne 1918. uspjelo je ponovno oživjeti pojedine komponente virusa i tako pojasniti nedoumice u vezi s molekularnom osnovom patogenosti.

Isto tako znanstvenici u cijelom svijetu intenzivno se bave ispitivanjem molekularne strukture virusa gripe A/H5N1/ koji bi, smatra se, mogao biti uzročnikom slijedeće pandemije humane influence.

U ovom pregledu pokušati ćemo usporediti osnovne karakteristike oba virusa i pokušati odgovoriti na pitanje koliko su oni slični, a koliko različiti [1].

Osobitosti virusa influence

Postoje tri tipa gripe – A, B i C. Od tipa A mogu se razboljeti ljudi, ali i mnoge životinjske vrste – ptice, svinje, konji... virus B i C »rezervirani« su samo za ljude ali nemaju toliko veliku važnost za čovjeka jer izazivaju blaže kliničke slike i ne uzrokuju pandemije.

Pandemijski potencijal ima jedino virus A i to tipovi hemaglutinina – H1, H2, H3 (to je pored tzv. neuraminidaze jedan od najvažnijih faktora virulentnosti) [2].

Kod vodenih ptica (divlje patke, guske) su u probavnom sustavu odnosno izmetu pronađeni izrazito virulentni tipovi H5 i H7 hemaglutinina virusa gripe no u njih najčešće ne izazivaju bolest, već im infekcija prolazi najčešće asimptomatski [3, 4]. Tek prelaskom na domaću perad virus izaziva epidemije s velikom smrtnošću.

U zadnjim godinama primijećeno je da je došlo do poremećaja u filogenetskoj evoluciji virusa influence kod divljih ptica. Virus influenza divljih ptica koji su do sada u njih bili u evolucijskoj stazi nakon infekcije domaće peradi mutirali su i vratili se u divlje ptice kao potencijalno opasni i za njih. Na taj način novo mutirani virusi influence postali su mnogo opasniji i za čovjeka.

Ptice su istodobno i jedina životinjska vrsta kod koje je pronađeno svih 16 tipova hemaglutinina gripe kao i njezi-

nih 9 neuraminidaza tako da se kod njih nalazi kompletna paleta svih tipova virusa a to je onda velika mogućnost za stvaranje novih virusnih sojeva.

Struktura virusa influence

Virus je inače po svojoj strukturi kuglastog oblika i na površini ima karakteristične nastavke hemaglutinin i neuraminidazu koji čine čak 40 posto njegove mase.

Osnovu genetskog materijala virusa influence tipa A čini jednolančana ribonukleinska kiselina podijeljena u 8 dijelova, koja je između ostalog i zbog tog razloga vrlo sklona mutacijama prilikom replikacije genetskog materijala [5, 6, 7].

Osam segmenata RNK determinira i 10 najvažnijih proteina virusa influence, a to su: hemaglutinin (HA), neuroaminidaza (NA), protein membrane (M1), protein ionskih kanala (M2), kompleks transkriptaza s nukleoproteinom (PB1, PB2, PA + NP) i nestrukturalni proteini (NS1 i NS2) [8].

Kako bi se uhvatili za epitel satnice respiratornog trakta čovjeka moraju se pomoću receptora hemaglutinina uz enzim proteazu (nalazi se isključivo u epitelnim stanicama respiratornog sustava) podijeliti na H1 i H2 na mjestu cijepanja tzv. Cleavage site-u.

Da bi se virus prihvatio za stanicu potrebno je da posjeduje specifično mjesto vezanja tzv. Binding site-u.

Mjesto vezanja karakteristično je za vrstu, pa tako aminokiselina /226 leucin/ govori da se radi o humanom tipu influence, a aminokiselina /226 glutamin/ označava ptičji soj virusa influence.

Da bi se vezali za epitelne stanice domaćina potrebno je da se oligosaharid, sijalinska kiselina koji je specifičan za čovjeka (α 2, 6) ili za ptice (α 2, 3), veže za hemaglutinin virusa [9, 10].

Smatra se kako neki virulentni tipovi virusa gripe mogu koristiti plazminogen kao enzim, a kako se on nalazi u mnogim tkivima i organima čovjeka klinička je slika bolesti tada mnogo teža jer je moguće da virus tada dođe i do drugih organskih sustava a ne samo do respiratornog trakta. U tijelu tada mogu nastati brojne upale od bubrega do srčanog mišića (miokarditisa) odnosno njegove ovojnice (perikarditisa). Mnoge bolesnike s transplantiranim srcem, među ostalim, do tog zahvata dovedu i posljedice (ne)preležane gripe i njene komplikacije. Neuraminidaza pak ima zadaću da razara proteine služi epitelnih stanica respiratornog trakta smanjujući im viskoznost te istodobno pospješujući vezivanje virusa gripe, a ujedno je i katalizator koji regulira brzinu otpuštanja virusa iz zaražene stanice kao jedna vrsta »receptor destroying enzime« i tako direktno utječe na virulentnost samog virusa [11, 12].

Zbog takve aktivnost neuraminidaze mnogi autori smatraju da joj bolje odgovara naziv sialidaza.

Usporedba pandemijskog virusa A/H1N1/ iz 1918. godine s potencijalnim pandemijskim virusom A/H5N1/ iz 2005. godine

Virus influence iz Velike pandemije 1918. pokazivao je istu kliničku sliku u svim dijelovima svijeta pa je na temelju najnovijih ispitivanja sačuvanih virusa testirana homogenost koja je i potvrdila očekivanja te iznosi 98,9–99,8 % sličnosti nukleotidnih sekvenci na mjestu vezanja najvažnijeg glikoproteina – hemaglutinina [13, 14].

1918. – 1919. pandemija započela je u nekim dijelovima Svijeta prvenstveno u Španjolskoj, Francuskoj i Engleskoj u proljeće 1918., a onda se tek u jesen proširila početkom rujna po Europi, sjevernoj Americi i Africi. Drugi val epidemije krenuo je u prvom mjesecu 1919. a smatra se da je zahvatio 30 % svjetske populacije.

Mjereći stupanj genetičke homogenosti HA virusa iz pandemija 1957. i 1968. također je ustanovljena visoka homogenost.

Na temelju najnovijih ispitivanja koja su publicirana u zadnjih par mjeseci došlo se do nekih novih spoznaja [15, 16, 17].

Virus A/H1N1/ iz 1918. posjeduje jednu aminokiselinu na mjestu cijepanja hemaglutinina te je stoga monobazan, iako se do sada smatralo da je uvjet za visoku patogenost virusa višestruki ostaci aminokiselina na cleavage site-u [18, 19].

Na temelju ispitivanja polymeraza kompleksa (PB1, PB2, PA) koji su uključeni u mnoge aspekte replikacije virusa a sudjeluju u interakciji s faktorima specifičnosti, primijećeno je da se 1918. humani influenza virus razlikuje od ptičjih nukleotidnih sekvenci u samo malom broju aminokiselina. Na temelju toga je postavljena hipoteza da je virus izveden od ptičjeg, kratko prije pandemije [20]. Znajući za teoriju da novi virusi influence nastaju rekombinacijom u svinji koja ima receptore za ljudske i ptičje viruse, na koji su način nastali pandemijski sojevi iz 1957. i 1968. godine i to u vrlo kratkom vremenu od oko pet godina, ovakva hipoteza unosi novu zabrinutost u spoznaje da iako virus A/H5N1/ cirkulira od 1949. godine bez značajnijih antigenskih izmjena još uvijek može biti kandidat za novi pandemijski soj.

Deset amino kiselinskih izmjena u proteinima proteaze razlikuju 1918. humane viruse od avian virusa. Isto tako primijećeno je da je kod A/H5N1/ virusa na ciljnim proteazama od 2232 promijenjeno također sličnih deset amino kiselina. Važna je također spoznaja da je PB1 protein kao mogući adaptabilni specijes faktor bio promijenjen u sve tri velike pandemije [21, 22, 23].

PB1 protein 1918. godine razlikovao se u 7 rezidua od avian sojeva, a H5N1 u 4–7. PB2 protein iz 1918. razlikovao se u 5 rezidua od avian sojeva, a H5N1 također 5.

PA protein iz 1918. razlikovao se u 4–7 rezidua amino kiselina, a H5N1 u 7.

Na temelju genetskog sekvencioniranja virusa 1918. dokazano je također karakteristično za humane izolate lizin rezidua na poziciji PB2/627 za koju se smatra da participira u adaptaciji na domaćina što se u pokusima na ekperimentalnim životinjama dokazalo kao faktor visoke patogenosti [24, 25]. Od 345 ispitivanih avian sojeva 19 njih imaju takvu promjenu a od toga 18 su ptičji H5N1. Od 37 ispitivanih humanih izolata takva promjena uočena je na 11 i to sve u clasteru br. 1 porijeklom iz Indokine i 1* iz Hong Konga. Isto takva mutacija primijećena je kod 6 od 7 tigrova oboljelih u tajlandskom zoološkom vrtu, a bila je prisutna u H7N7 odgovornom za jedini smrtni ishod u Nizozemskoj 2003. U novije vrijeme ova mutacija uočena je i kod sojeva virusa izoliranog u Turskoj koji su isto tako izazvali oboljenje s visokom smrtnošću [26, 27].

Međutim najefikasnija transkripcijska aktivnost kod virusa viđena je s avian promijenjenim PB1 iako su PB2, PA i NP ostali od humanog virusa. Akvirirajući dakle rekombinirani avian PB1 može omogućiti replikativne prednosti novog virusa što je ujedno i objašnjenje za 3 zadnje pandemije koje su imale vrlo sličan avian PB1 protein [28].

Osnovni patološki mehanizam tog virusa izgleda da je ipak neuraminidaza koja jedino kod ovog virusa preuzima funkciju proteaze pa bi se uvjetno moglo reći da je virus iz 1918. »selfmade« organizam jer je na taj način imao mogućnost infekcije bez enzima domaćina što je velika morfološka prednost u odnosu na ostale poznate viruse influence [29, 30].

Na temelju navedenih podataka zaključeno je da je donor – davaoc virusa iz 1918. bio u evolucijskoj izolaciji od influenza avian virusa koji su bili prisutni u cirkulaciji.

Stoga do sad postojeća hipoteza da je virus A/H1N1/ iz »velike pandemije« – 1918. nastao rekombinacijom humanih i avian sojeva nije više održiva i s velikom vjerojatnošću smatra se da je mehanizam nastanka tog najpatogenijeg agensa ljudske civilizacije adaptivna mutacija [31].

Gledajući dokazane A/H5N1/ viruse od 1997. do početka 2005. možemo tvrditi da su dokazani u epidemijama peradi 9 azijskih zemalja: Kambodža, Kina, Indonezija, Japan, Laos, Malezija, Južna Koreja, Tajland i Vijetnam.

Na temelju analize HA gena podijeljeni su na dvije grupe 1 i 2 s tim da je grupa 1 izolirana od ljudi i ptica u Vijetnamu, Tajlandu i Kambodži, a kod ptica u Laosu i Maleziji. Grupa 2 izolirana je kod ptica isključivo u Kini, Japanu i J. Koreji i nije uzrokovala bolest kod čovjeka. Virusi izolirani iz ptica i ljudi u Hong Kongu 1997. i 2003. čine grupe 1* i 3 [32, 33].

Multiple rezidue amino kiselina njih 4 i više na mjestu cijepanja hemaglutinina čine virus visoko patogenim, a do

sada su dokazani u grupama 1, 1* i 3. S obzirom da je A/H5N1/ dokazan iz vodenih ptica u Hrvatskoj determiniran kao virus sa 6 ostataka amino kiselina smatra se da pripada jednoj od gore navedenih grupa.

U 2006. godini virus je dokazan također u većini europskih zemalja što stručnjake ne bi trebalo previše čuditi jer migracijske rute ptica selica preklapaju se u cijelome svijetu tako da je teoretski moguće da virus s jednog kraja svijeta na drugi stigne u gastrointestinalnom traktu njegovog nosioca.

Novije genetske analize virusa A/H5N1/ bit će dostupne u slijedećim mjesecima i očekuju se nove mutacije koje su za sada najčešće blizu mjestu vezanja hemaglutinina (HA/223 jugoistočna Azija, HA/227 Turska). Na taj način za sada virus A/H5N1/ zaobilazi uobičajene mehanizme vezanja i samo sporadično se javlja kao bolest ljudi.

Za sada taj virus kod oboljelih osoba još uvijek se luči u vrlo niskom titru što je za razliku od virusa iz 1918. koji je imao izuzetno visok titar infektivnih čestica osnovni faktor zbog čega nema interhumanog načina prijenosa.

Ono što je zajedničko A/H1N1/ iz 1918. i A/H5N1/ iz 2005. je vrlo visoki letalitet kod eksperimentalnih životinja koji je kod jednog i drugog 100 puta veći od ostalih poznatih virusa influence [34].

Isto tako primijećeno je da su sojevi A/H5N1/ iz 2006. u usporedbi s A/H5N1/ iz 1997. također letalniji za eksperimentalnije životinje te da se dulje zadržavaju u vanjskoj sredini. Noviji tipovi virusa A/H5N1/ također mnogo su letalniji i za svoje nosioce divlje ptice koje su donedavno bile isključivo rezervoar tih virusa i kod kojih se nalazio u evolucijskoj stazi (Centralna Kina / 2005., smrt 6 000 migratornih ptica). S druge strane pak uočeno je da neke druge životinje kao domaće patke preuzimaju ulogu virusnog rezervoara te luče virus bez znakova oboljenja.

Literatura

- [1] Stevens J, Wilson IA. Resurrecting the Dead – Structural Analysis of Hemagglutinin from the 1918 Influenza Pandemic Strain. *Proc Natl Acad Sci CA*. 2004 August.
- [2] Jue Chen, Hong Ho Lee, David A. Steinhauer, David J. Stevens, John J. Skehel, Don C. Wiley. Structure of the Hemagglutinin Precursor Cleavage Site, a Determinant of Influenza Pathogenicity and the Origin of the Labile Conformation. *Cell*. 1998; 95: 409–17.
- [3] Sturm-Ramirez KM, Ellis T, Bousfield B, Bissett L, Dyrting K, Rehg JE, et al. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *J Virol*. 2004;78: 4892–901.
- [4] Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC. X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:11181–6.
- [5] Wilson IA, Cox NJ. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu Rev Immunol*. 1990;8:737–71.
- [6] Fodor E, Devenish L, Engelhardt OG, Palese P, Brownlee GG, Garcia-Sastre A. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol*. 1999;73:9679–82.
- [7] Hoffmann E, Webster RG. Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids. *J Gen Virol*. 2000;81:2843–7.
- [8] Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:6108–13.
- [9] Stephenson I, Wood JM, Nicholson KG, Zambon MC. Sialic acid receptor specificity on erythrocytes affects detection of antibody to avian influenza haemagglutinin. *J Med Virol*. 2003;70:391–8.
- [10] Baigent SJ, McCauley JW. Glycosylation of haemagglutinin and stalk-length of neuraminidase combine to regulate the growth of avian influenza viruses in tissue culture. *Virus Res*. 2001;79: 177–85.
- [11] Mitnaul LJ, Matrosovich MN, Castrucci MR, Tuzikov AB, Bovin NV, Kobasa D, et al. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. *J Virol*. 2000;74:6015–20.
- [12] Garry R. Whittaker. Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for medicine. *Molecular Medicine*. 2001; February:11.
- [13] Ann HR, Thomas AJ, Raina ML, Alex JE, Rod SD, Colin LB, John SO, Jeffery KT. 1918 Influenza Pandemic Caused by Highly Conserved Viruses with Two Receptor-Binding Variants. *CDC*. 2003 Oct; 09 (10).
- [14] Taubenberger JK, Reid AH, Janczewski TA, Fanning TG. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. *Philos Trans R Soc Land B Biol Sci* 2001;356:1829–39.
- [15] Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 2005;437:889–93.
- [16] Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV i sur. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 2005;310:77–80.
- [17] Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Taubenberger JK, Palese P, Swaney DE, Basler CF. Pathogenicity and immunogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 March 2; 101(9): 3166–3171.
- [18] Fislova T, Kostolansky F. The factors of virulence of influenza A virus. *Acta virologica* 2005; 49:147–157.
- [19] Stevens J, Corper AL, Basler CF, Taubenberger JK, Palese P, Wilson IA. Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science*. 2004 Mar 19; 303 (5665): 1787–8.
- [20] Jeffery K. Taubenberger, Ann H. Reid, Rain M. Lourens, Ruixue Wang, Guozhong Jin, Thomas G. Fanning. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature*. 2005 October 06; 437: 889–893.
- [21] Subbarao EK, London W, Murphy BR. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol*. 1993; 67: 1761–1764.
- [22] Naffakh N, Massin P, Escriviou N, Crescenzo-Chaigne B, van der Werf S. Genetic analysis of the compatibility between polymerase proteins from human and avian strains of influenza A viruses. *J Gen Virol*. 2000;81: 1283–1291.
- [23] Puthavathana P, et al. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J Gen Virol*. 2005;86:423–433.

- [24] Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*. 2004;430:209–13
- [25] World Health Organization. Confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) since 28 January 2004 [on the Internet]. 2005 Jan 26 [cited 2005 Aug 1].
- [26] Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, Fouchier R, Amonsin A, Payungporn S, et al. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:2189–91.
- [27] Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R, Damrongwatanapokin S, Theamboonlers A, Payungporn S, et al. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:699–701.
- [28] Robert B Belshe. The Origins of Pandemic Influenza – Lessons from the 1918 Virus. *N Engl J Med*. 2005;353:2209–2211.
- [29] Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, Taubenberger JK. Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus neuraminidase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97: 6785–6790.
- [30] Reid AH, Taubenberger JK, Fanning TG. Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus. *Nature Rev Microbiol*. 2004;2:909–914.
- [31] Perdue ML, Suarez DL. Structural features of the avian influenza virus hemagglutinin that influence virulence. *Vet Microbiol*. 2000;74:77–86.
- [32] Bender C, Hall H, Huang J, Klimov A, Cox N, Hay A, et al. Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997–1998. *Virology*. 1999;254: 115–23.
- [33] Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, Webster R. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol*. 1999;73:1146–55.
- [34] Mase M, Tsukamoto K, Imada T, Imai K, Tanimura N, Nakamura K, et al. Characterization of H5N1 influenza A viruses isolated during the 2003–2004 influenza outbreaks in Japan. *Virology*. 2005;332:167–76.