

XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐẶC TÍNH VI RÚT CÚM GIA CẦM ĐỘC LỰC CAO H5N1 NHÁNH 7 PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM

*Nguyễn Tùng¹, Đỗ Thị Hoa², Ngô Thị Thu Hương²,
Nguyễn Văn Cẩm³, Nguyễn Bá Hiên⁴*

TÓM TẮT

Dịch cúm gia cầm độc lực cao H5N1 đã trở thành dịch bệnh địa phương trên gia cầm ở một số nước châu Á bao gồm Việt Nam. Gần đây, vi rút cúm H5N1 nhánh 7, của dòng Á-Âu đã được phân lập từ gà nhập lậu tại cửa khẩu Lạng Sơn. Sự khác biệt của gen HA (hemagglutinin) về mức độ nucleotide và axit amin của vi rút này so với các vi rút thuộc các nhánh khác trước đây đã được xác định. Vi rút H5N1 nhánh 7 cũng khác biệt về tính kháng nguyên so với các nhánh vi rút đang lưu hành tại Việt Nam (nhánh 1 và 2.3.4). Bên cạnh việc giám sát vi rút tại cửa khẩu, trong chương trình giám sát vi rút tại chợ gia cầm sống, chúng tôi cũng đã phát hiện thêm một số chủng vi rút H5N1 khác thuộc nhánh 7. Những phát hiện từ nghiên cứu này chỉ ra rằng vi rút H5N1 nhánh 7 (HA) đã tiếp tục tiến hoá trên gia cầm Đông Nam Á tạo nên hiện tượng lệch kháng nguyên điển hình liên quan đến các vi rút H5N1 khác hiện đang lưu hành tại Việt Nam.

Từ khoá: Cúm gia cầm độc lực cao, Virut H5N1 nhánh 7, Đặc tính kháng nguyên

Characterisation of highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses clade 7 isolated in Vietnam

*Nguyễn Tùng, Đỗ Thị Hoa, Ngô Thị Thu Hương,
Nguyễn Văn Cẩm, Nguyễn Bá Hiên*

SUMMARY

Highly pathogenic avian influenza H5N1 has become an endemic poultry disease in several Asian countries, including Vietnam. Recently, clade 7 H5N1 viruses of the Eurasian lineage were isolated from chickens seized at ports of entry in Lang Son province. Nucleotide and amino acid divergence across the hemagglutinin (HA) protein gene of these isolates in comparison to previously described clade 7 viruses was identified. Clade 7 viruses are antigenically distinct from contemporary strains of H5N1 known to circulate in Vietnamese poultry (clade 1 and clade 2.3.4). In addition to virus surveillance at border, in subsequent surveillance in live poultry markets we also identified additional other clade 7 isolates. Findings from these studies indicate that viruses with clade 7 HA have continued to evolve in Southeast Asian poultry, leading to significant antigenic drift relative to other H5N1 viruses currently circulating in Vietnam.

Key words: Highly Pathogenic Avian Influenza, H5N1 clade 7 virus, Antigenic characteristics

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam bệnh Cúm gia cầm độc lực cao do vi rút H5N1 xảy ra từ cuối năm 2003 và đầu năm 2004. Kể từ đó đến nay Dịch cúm gia cầm H5N1 vẫn tiếp tục xảy ra ở Việt Nam. Cũng trong thời gian qua, vi rút cúm gia cầm H5N1 cũng gây nên dịch ở các nước lân cận và trong khu vực như Trung Quốc, Lào, Campuchia, Thái Lan, Indonesia...

Nhiều nghiên cứu cho thấy có nhiều dòng vi rút cúm H5N1 khác nhau đã lưu hành trong khu vực cũng như đã thâm nhập vào Việt Nam. Các nghiên cứu về phát sinh loài vi rút H5N1 ở Việt Nam cũng cho thấy có nhiều nhánh (clade) vi rút đã xâm nhập và tái xuất hiện trong nước trong những năm qua (Nguyen, T et al., 2009; Nguyen T.D et al., 2008; Smith et al., 2006; Wan et al., 2008). Mặc dù cơ chế xâm nhập và lây lan của vi rút vẫn còn chưa được xác định rõ, nhưng khả năng vi rút tiếp tục tái xuất hiện sẽ có thể làm phức tạp thêm cho công tác phòng chống cúm gia cầm ở Việt Nam.

Từ cuối năm 2005, để phòng chống dịch cúm gia cầm gây bệnh và gây nguy hiểm cho con người, Việt Nam đã áp dụng chương trình tiêm phòng cúm gia cầm H5N1 trong cả nước. Để đảm bảo và giám sát chủ động kết quả tiêm phòng Cục Thú y đã tiến hành các chương

¹Viện sau đại học, Đại học Nông nghiệp Hà Nội; ²Trung tâm Chẩn đoán Thú y TUV, ³Trung tâm Thú y cộng đồng, Hội Thú y VN; ⁴Khoa Thú y, Đại học Nông nghiệp Hà Nội;

trình giám sát sau tiêm phòng và đồng thời giám sát sự lưu hành của vi rút H5N1. Chương trình giám sát vi rút đã được thực hiện ở những vùng nguy cơ (nơi từng xảy ra dịch) và những nơi có gia cầm nhập lậu vào Việt Nam.

Từ năm 2008, các cơ quan chức năng đã bắt giữ gà nhập lậu tại tỉnh Lạng Sơn, và ngành thú y đã lấy mẫu để phát hiện sự hiện diện của vi rút H5N1. Bên cạnh việc xác định đặc tính của các vi rút H5N1 ở các ổ dịch trên gia cầm của Việt Nam, thì việc xác định đặc tính của các vi rút H5N1 từ các chương trình giám sát vi rút cũng rất quan trọng, đặc biệt là các mẫu từ cửa khẩu và các mẫu tại chợ gia cầm sống. Kết quả của các chương trình giám sát này sẽ có tính dự báo đối với các ổ dịch cúm gia cầm có khả năng xảy ra trong tương lai.

Các mẫu dương tính vi rút lấy từ các bệnh phẩm đã được phân lập, giải trình tự gen HA (Hemagglutinin) và xác định thuộc nhánh 7, theo phân loại của hướng dẫn danh pháp H5N1 WHO/OIE/FAO (WHO/OIE/FAO, 2008). Điều tra ban đầu cho thấy, những loại vi rút này rất khác biệt với vi rút nhánh 7 đã xác định trước kia và chúng tạo thành ít nhất hai phân nhóm di truyền khác nhau trong nhánh 7. Ngoài ra, phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) cho thấy không có phản ứng chéo khi hai phân nhóm của vi rút đã được xét nghiệm đối với các chủng vi rút H5N1 khác hiện nay lưu hành tại Việt Nam.

Sau đó chương trình giám sát vi rút tại chợ gia cầm sống ở Hải Dương gần đây đã phát hiện một số chủng liên quan về mặt di truyền đối với vi rút nhánh 7. Chúng tôi cũng thực hiện việc xác định đặc tính phát sinh loài của những vi rút này để điều tra mối quan hệ của chúng với các vi rút được phát hiện tại tỉnh biên giới Lạng Sơn.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- Các mẫu tắm bông ngoáy ở nhóp từ gà nhập lậu, gà tại chợ gia cầm sống được chuyển về Phòng Vi rút - Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương để xét nghiệm. Các mẫu tắm bông được bảo quản trong dung dịch vận chuyển và bảo quản lạnh cho đến khi xét nghiệm. Chiết tách ARN của vi rút bằng kit chiết tách Qiagen Rneasy minikit và xét nghiệm sàng lọc bằng phản ứng Realtime RT-PCR phát hiện cúm A.

- Các mẫu xét nghiệm dương tính cúm A được tiến hành phân lập vi rút, sau đó chiết tách ARN từ dịch niệu mô của phôi trứng phân lập vi rút và chiết tách ARN (như trên), khuếch đại gen HA (toàn bộ chiều dài) bằng kit RT-PCR 1 bước (Promega hoặc Invitrogen). Các đoạn sản phẩm DNA được giải trình tự trên hệ thống máy giải trình tự ABI 3730.

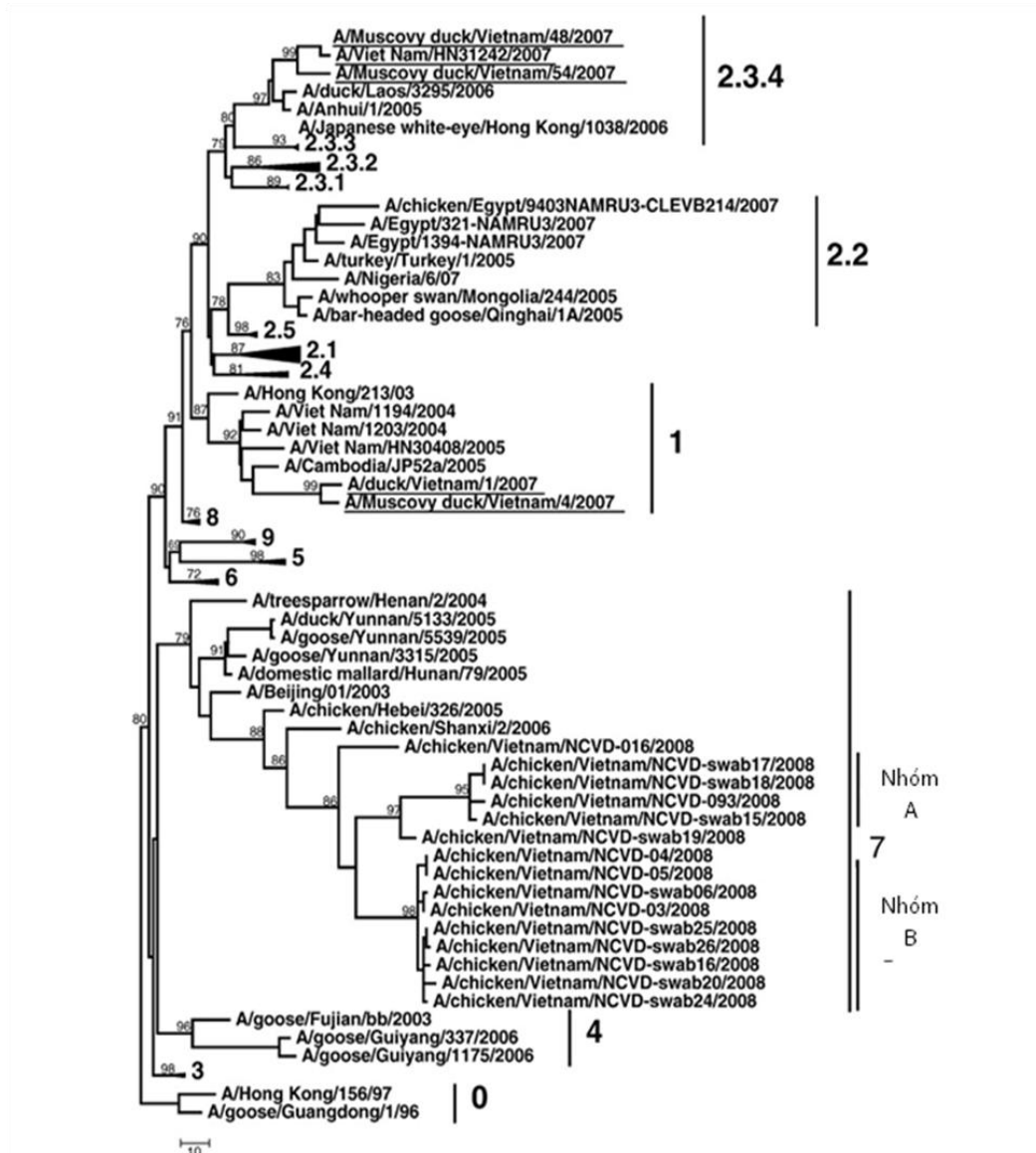
- Phân tích (hệ phả) phát sinh loài dựa trên gen HA bao gồm các vi rút nhánh 7 đã phát hiện được cũng như các vi rút từ dòng H5N1 Á-Âu được phân lập tại Việt Nam và các nước khác (lấy từ cơ sở dữ liệu công cộng). Cây phát sinh loài dựa trên chiều dài đầy đủ của khung đọc mở gen HA. Phân tích dựa trên phương pháp Neighbor-joining (NJ) sử dụng phần mềm MEGA 4 (Kumar *et al.*, 2004). Lấy gốc tại nhánh 0 gồm 2 chủng A/goose/Guangdong/1/1996 và A / Hồng Kong/156/97.

- Xác định đặc tính kháng nguyên của vi rút cúm gia cầm H5N1 phân lập được bằng phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) bằng kháng huyết thanh tối miễn dịch với các chủng vi rút H5N1 thuộc các nhánh 1, 2.3.4 và 7.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân tích phát sinh loài

Phân tích trình tự ban đầu của các mẫu dương tính vi rút H5N1 nhánh 7 được phát hiện ở gà tại các chợ gia cầm sống ở Hải Dương cho thấy chúng cũng giống như nhánh vi rút 7 trước đây được phân lập từ gà bị thu giữ tại cửa khẩu Lạng Sơn. Chiều dài toàn bộ gen HA khung đọc mở (ORF) của mỗi vi rút được giải trình tự từ sử dụng các cặp mồi đặc hiệu cho gen HA của cả vi rút H5N1 và cúm A. Có tổng cộng 15 mẫu được xác định là virus H5N1 nhánh 7 đã được phát hiện. Vi rút H5N1 nhánh 7 đã được phát hiện trước đó ở tỉnh Sơn Tây Trung Quốc năm 2006 (A/chicken/Shanxi/2/2006). Phân tích các mẫu vi rút H5N1 clade 7 cho thấy có hai phân nhánh nhỏ gọi là nhóm A và nhóm B với virus A/chicken/Vietnam/NCVD/016-2008 được coi là vi rút gốc ở Việt Nam (Hình 1).



Hình 1. Mối quan hệ phát sinh loài của các gen HA của các vi rút nhánh 7 được lập bằng phương pháp phân tích neighbor-joining sử dụng phần mềm MEGA 4.

Các gen HA của nhóm A hoặc B có sự khác biệt rất ít trong nhóm về chuỗi nucleotid hoặc acid amin với sự khác biệt trung bình tổng thể của nucleotid là 0,4% và acid amin là 0,4%. Ngược lại, sự khác biệt giữa hai nhóm này đạt trung bình 4,1% và 5,7% đối với mức độ nucleotid và mức độ axit amin trên gen HA (Bảng 1). Mức độ khác biệt cao tương đương với sự thay thế ≥ 30 acid amin giữa các chuỗi protein HA ở hai nhóm. Ngoài ra, các số liệu sự khác biệt trung bình của tất cả các virut nhánh 7 đã giải trình tự trong nghiên cứu này so với tổ tiên gần nhất HA là A/chicken/Shanxi/2/2006 là 3,8% và 5,8% ở mức độ nucleotid và acid amin (Bảng 1). Tóm lại, những dữ liệu này cho thấy vi rút A/chicken/Shanxi/2/2006 là tổ tiên gần nhất của nhánh 7 HA gen được xác định trong nghiên cứu này.

Bảng 1: Mức độ khác biệt về di truyền trên gen HA (Hemagglutinin)

Vi rút (Phân theo nhánh HA)	<i>Acid amin</i>									
	A/goose/ Guangdong /1/1996 (0)	A/Viet Nam /1203/2004 (1)	A/Anhui/1/2005 (2.3.4)	A/Beijing/01/2003 (7)	A/chicken /Shanxi/2/2006 (7)	A/chicken /Vietnam/NCVD-016 /2008 (7, NCVD)	A/chicken /Vietnam/NCVD-093 /2008 (7, NCVD nhóm A)	A/chicken /Vietnam /NCVD-04/2008 (7, NCVD nhóm B)	A/chicken /Vietnam /NCVD-05/2008 (7, NCVD nhóm B)	A/chicken /Vietnam /NCVD-03/2008 (7, NCVD nhóm B)
A/goose/Guangdong/1/1996(0)		3.8	4.5	3.6	6.5	8.4	9.1	9	8.8	9
A/Viet Nam/1203/2004 (1)	3.5		3.4	4.7	7.2	9	9.7	9.3	9.1	9.3
A/Anhui/1/2005 (2.3.4)	4	3.3		4.5	7.2	9	9.1	9.1	9	9.1
A/Beijing/01/2003 (7)	3.1	3.7	4.1		5	7	7.9	7.2	7	7.4
A/chicken/Shanxi/2/2006 (7)	4.6	5.3	5.6	3.3		5.4	5.9	5.9	5.7	6.1
A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (7, NCVD)	6.2	6.6	6.8	4.4	3.3		6.1	3.2	3.1	3.4
A/chicken/Vietnam/NCVD-093/2008 (7, NCVD nhóm A)	6.3	6.8	6.9	4.7	3.6	4		5.7	5.6	5.9
A/chicken/Vietnam/NCVD-04/2008 (7, NCVD nhóm B)	6.8	7	7	4.7	3.9	2.8	4.1		0.2	0.5
A/chicken/Vietnam/NCVD-05/2008 (7, NCVD nhóm B)	6.7	6.9	7	4.7	3.9	2.8	4.1	0.1		0.4
A/chicken/Vietnam/NCVD-03/2008 (7, NCVD nhóm B)	6.6	6.9	6.9	4.6	3.8	2.7	4	0.4	0.3	
	<i>Nucleotid</i>									

3.2. Phân tích đặc tính kháng nguyên.

Các vi rút nhánh 7 phân lập trong nghiên cứu này được xác định đặc tính kháng nguyên bằng phản ứng ngăn trở ức chế hồng cầu bằng kháng huyết thanh chồn (ferret) chế bằng các vi rút H5N1 thuộc nhánh 1, 2.3.4 và 7 thu thập được tại Việt Nam (bảng 2). Kết quả phản ứng HI chéo cho thấy sự tương đồng cao giữa các vi rút và kháng huyết thanh đồng chủng (hiệu giá HI ≥ 160) nhưng không có phản ứng chéo hoặc phản ứng chéo có hiệu giá rất thấp giữa các loại vi rút từ các nhánh khác nhau (Bảng 2). Kháng huyết thanh chế từ vi rút cúm A/Vietnam/1203/2004 (nhánh 1) không có phản ứng chéo đáng kể với bất kỳ vi rút nhánh 7 nào trong cả hai nhóm A và B. Tuy nhiên, kháng huyết thanh kháng A/chicken/Vietnam/NCVD-035/2008 (nhánh 2.3.4) có phản ứng chéo ở mức độ thấp với các vi rút của nhánh 7. Kháng huyết thanh nhánh 7 được chế từ ba loại vi rút khác nhau: A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (gốc phát sinh), A/chicken/Vietnam/NCVD-03/2008 (nhóm B), và A/chicken/Vietnam/NCVD-093/2008 (nhóm A) để thực hiện phản ứng ngăn trở ngưng kết chéo với các vi rút của các nhánh khác. Trong khi kháng huyết thanh kháng vi rút A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 (gốc phát sinh loài của hai nhóm A và B) không có phản ứng với các vi rút nhánh 1 hoặc nhánh 2.3.4, có 1 vi rút của nhóm B phản ứng chéo ở mức độ hạn chế với các vi rút của nhánh 2.3.4 nhưng nhóm

A thì không có phản ứng chéo. Hiện tượng kháng huyết thanh kháng vi rút cúm A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008 có phản ứng chéo rất hạn chế hoặc không có phản ứng chéo với các vi rút khác thuộc nhánh 7 cho thấy sự tương đồng về mặt kháng nguyên giữa các vi rút trong nhánh 7 là rất thấp. Tuy nhiên giữa các vi rút nhánh 7 nằm trong cùng phân nhóm lại có mức độ phản ứng chéo rất cao. Ví dụ, kháng huyết thanh kháng A/chicken/Vietnam/NCVD-03/2008 (nhóm 7B) đã có hiệu giá là 160 đối với vi rút nhóm 7B là vi rút A/chicken/Vietnam/NCVD-04/2008. Tương tự như vậy, không có phản ứng chéo (hiệu giá HI <10) giữa kháng huyết thanh nhóm 7A và vi rút nhóm 7B, cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các phân nhóm của nhánh 7.

Mặc dù những chủng vi rút cúm gia cầm mới có khả năng thâm nhập vào một quốc gia do vận chuyển gia cầm hoặc chim di cư, nhưng chỉ có rất ít nghiên cứu cung cấp bằng chứng trực tiếp để hỗ trợ cho giả thuyết này (Chen, H et al., 2006; Ducatez et al., 2007; Salzberg et al., 2007; Wang et al., 2008). Trong khi tập hợp các bằng chứng cho thấy rằng các loài chim di cư đã đóng một vai trò chính trong sự lây lan của vi rút cúm nhánh 2.2 ở châu Âu, Trung Đông và Châu Phi sau khi các ổ dịch cúm phát sinh ở hồ Thanh Hải (Qinghai) năm 2005 (Wang, G. et al., 2008), các nghiên cứu khác cho thấy buôn bán chim, gia cầm và /hoặc các sản phẩm của nó một cách hợp pháp hoặc bất hợp pháp đều có thể chịu trách nhiệm về việc làm lây lan vi rút H5N1 giữa các vùng (Lee et al., 2007; Mase et al., 2005; Steensel et al., 2007; Tumpey et al., 2002). Ngoài các cơ chế thông thường về sự lây lan, các dữ liệu của nghiên cứu này nêu bật tầm quan trọng của kiểm soát biên giới quốc tế và công việc giám sát thường xuyên nhằm kiểm soát sự lây lan của vi rút theo phân bố địa lý.

Bảng 2. Xác định đặc tính kháng nguyên của virus nhánh 7 bằng phản ứng ngăn trở ngưng kết hồng cầu

Kháng huyết thanh chuẩn								
Kháng nguyên chuẩn	Nhánh	0	1	2.3.4	2.3.4	7	7B	7A
		GS/GD	VN/1203	AN/1	CK/VN/35	CK/VN/016	CK/VN/03	CK/VN/93
A/goose/Guangdong/1/96	0	1280	<10	80	80	<10	<10	<10
A/Vietnam/1203/2004	1	80	320	80	160	<10	<10	<10
A/Anhui/1/05	2.3.4	20	<10	1280	160	20	<10	<10
A/chicken/Vietnam/NCVD-035/2008	2.3.4	<10	<10	80	320	<10	<10	<10
A/chicken/Vietnam/NCVD-016/2008	7	<10	<10	<10	10	640	<10	<10
A/chicken/Vietnam/NCVD-03/2008	7B	<10	<10	<10	20	20	160	<10
A/chicken/Vietnam/NCVD-93/2008	7A	<10	<10	<10	80	<10	<10	160
Kháng nguyên kiểm tra								
A/duck/Vietnam/NCVD-159/2008	2.3.4	<10	<10	160	40	10	<10	<10
A/duck/Vietnam/NCVD-160/2008	2.3.4	<10	<10	160	80	10	10	<10
A/chicken/Vietnam/NCVD-185/2008	2.3.4	<10	<10	320	80	10	10	<10
A/duck/Vietnam/NCVD-186/2008	2.3.4	<10	<10	320	80	10	10	<10
A/duck/Vietnam/NCVD-187/2008	2.3.4	<10	<10	320	80	<10	<10	<10
A/chicken/Vietnam/NCVD-188/2008	2.3.4	<10	<10	320	80	<10	<10	<10
A/chicken/Vietnam/NCVD-04/2008	7B	<10	<10	<10	10	<10	160	<10

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

- Việc phát hiện một nhánh vi rút H5N1 ngoại lai ở gia cầm bị bắt giữ khi nhập lậu vào Việt Nam, và sau đó phát hiện tại chợ gia cầm sống nhấn mạnh sự quan trọng cấp thiết cho việc giám sát vi rút cúm tại biên giới, cũng như tại chợ nơi các loài gia cầm và chim nhập lậu được bán.

- Nhóm các vi rút cúm H5N1 nhánh 7 HA là nhóm duy nhất có sự dị biệt rất lớn so với các nhánh vi rút khác đang lưu hành ở Việt Nam (nhánh 1 và nhánh 2.3.4). Sự khác biệt về nucleotide và acid amin ở cấp độ gene HA giữa hai phân nhóm của vi rút nhánh 7 được phát hiện tại Việt Nam (nhóm A và B) tương ứng đạt mức độ trung bình 4,1% và 5,7%, với sự thay thế hơn 30 axit amin giữa các vi rút của hai nhóm này.

- Các xét nghiệm ngăn trở ngưng kết hồng cầu (HI) đã chứng minh phản ứng chéo đặc hiệu chỉ có duy nhất giữa những vi rút thuộc cùng một phân nhóm của nhánh 7 và nhánh 7 HA cũng có sự khác biệt rất lớn về mặt kháng nguyên với các nhánh khác đang lưu hành ở Việt Nam.

- Đề nghị tiếp tục tiến hành giám sát vi rút trên gia cầm và chim hoang dã ở Việt Nam để xác định dòng virus H5N1 nhánh 7 có lây lan trong nước hay không?. Đồng thời xác định độc lực của chúng đối với gia cầm và sự lây nhiễm của chúng đối với sức khỏe con người, cũng như đánh giá tác dụng bảo hộ của vắc xin cúm H5N1 hiện đang sử dụng ở Việt Nam với vi rút này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen, H., G. J. Smith, K. S. Li, J. Wang, X. H. Fan, J. M. Rayner, D. Vijaykrishna, J. X. Zhang, L. J. Zhang, C. T. Guo, C. L. Cheung, K. M. Xu, L. Duan, K. Huang, K. Qin, Y. H. Leung, W. L. Wu, H. R. Lu, Y. Chen, N. S. Xia, T. S. Naipospos, K. Y. Yuen, S. S. Hassan, S. Bahri, T. D. Nguyen, R. G. Webster, J. S. Peiris, and Y. Guan. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:2845–2850. 2006.
2. Ducatez, M. F., C. M. Olinger, A. A. Owoade, Z. Tarnagda, M. C. Tahita, A. Sow, S. De Landtsheer, W. Ammerlaan, J. B. Ouedraogo, A. D. Osterhaus, R. A. Fouchier, and C. P. Muller. Molecular and antigenic evolution and geographical spread of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in western Africa. *J. Gen. Virol.* 88:2297–2306. 2007.
3. Lee, M. S., M. C. Deng, Y. J. Lin, C. Y. Chang, H. K. Shieh, J. Z. Shiau, and C. C. Huang. Characterization of an H5N1 avian influenza virus from Taiwan. *Vet. Microbiol.* 124:193–201. 2007.
4. Mase, M., M. Eto, N. Tanimura, K. Imai, K. Tsukamoto, T. Horimoto, Y. Kawaoka, and S. Yamaguchi. Isolation of a genotypically unique H5N1 influenza virus from duck meat imported into Japan from China. *Virology* 1339:101–109. 2005.
5. Nguyen, T., C. T. Davis, W. Stembridge, B. Shu, A. Balish, K. Inui, H. T. Do, H. T. Ngo, X. Wan, M. McCarron, S. E. Lindstrom, N. J. Cox, C. V. Nguyen, A. Klimov, and R. O. Donis. Characterization of a highly pathogenic avian influenza H5N1 virus sublineage in poultry seized at ports of entry into Vietnam. *Virology* 10:250–256. 2009.
6. Nguyen, T. D., T. V. Nguyen, D. Vijaykrishna, R. G. Webster, Y. Guan, M. J. Peiris, and G. J. Smith. Multiple sublineages of influenza A virus (H5N1), Vietnam, 2005–2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14:632–636. 2008.
7. Salzberg, S. L., C. Kingsford, G. Cattoli, D. J. Spiro, D. A. Janies, M. M. Aly, I. H. Brown, E. Couacy-Hymann, G. M. De Mía, H. Dung, A. Guercio, T. Joannis, A. S. Maken Ali, A. Osmani, I. Padalino, M. D. Saad, V. Savic ´, N. A. Sengamalay, S. Yingst, J. Zaborsky, O. Zorman-Rojs, E. Ghedin, and I. Capua. Genome analysis linking recent European and African influenza (H5N1) viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 13:713–718. 2007.
8. Smith, G. J., T. S. Naipospos, T. D. Nguyen, M. D. de Jong, D. Vijaykrishna, T. B. Usman, S. S. Hassan, T. V. Nguyen, T. V. Dao, N. A. Bui, Y. H. Leung, C. L. Cheung, J. M. Rayner, J. X.

- Zhang, L. J. Zhang, L. L. Poon, K. S. Li, V. C. Nguyen, T. T. Hien, J. Farrar, R. G. Webster, H. Chen, J. S. Peiris, and Y. Guan. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology* 350:258–268. 2006.
9. Steensels, M., S. Van Borm, M. Boschmans, and T. van den Berg. Lethality and molecular characterization of an HPAI H5N1 virus isolated from eagles smuggled from Thailand into Europe. *Avian Dis.* 51:401–407. 2007.
10. Tumpey, T. M., D. L. Suarez, L. E. Perkins, D. A. Senne, J. G. Lee, Y. J. Lee, I. P. Mo, H. W. Sung, and D. E. Swayne. Characterization of a highly pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat. *J. Virol.* 76:6344–6355. 2002.
11. Wan, X.-F., T. Nguyen, C. T. Davis, C. B. Smith, Z.-M. Zhao, M. Carrel, K. Inui, H. T. Do, D. T. Mai, S. Jadhao, A. Balish, B. Shu, F. Luo, M. Emch, Y. Matsuoka, S. E. Lindstrom, N. J. Cox, C. V. Nguyen, A. Klimov, and R. O. Donis. Evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses in Vietnam between 2001 and 2007. *PLoS ONE* 3: e3462. 2008.
12. Wang, J., D. Vijaykrishna, L. Duan, J. Bahl, J. X. Zhang, R. G. Webster, J. S. Peiris, H. Chen, G. J. Smith, and Y. Guan. Identification of the progenitors of Indonesian and Vietnamese avian influenza A (H5N1) viruses from southern China. *J. Virol.* 82:3405–3414. 2008.
13. Wang, G., D. Zhan, L. Li, F. Lei, B. Liu, D. Liu, H. Xiao, Y. Feng, J. Li, B. Yang, Z. Yin, X. Song, X. Zhu, Y. Cong, J. Pu, J. Wang, J. Liu, G. F. Gao, and Q. Zhu. H5N1 avian influenza re-emergence of Lake Qinghai: phylogenetic and antigenic analyses of the newly isolated viruses and roles of migratory birds in virus circulation. *J. Gen. Virol.* 89:697–702. 2008.
14. World Health Organization/World Organisation for Animal Health/Food and Agriculture Organization H5N1 Evolution Working Group. Toward a unified nomenclature system for highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) [Internet]. *Emerg. Infect. Dis.* 14, [modified 2008; cited 2009 November 20]. Available from: <http://www.cdc.gov/EID/content/14/7/e1>. html