

Mecanismo de neuroinvasión de un virus de influenza aviar de alta virulencia en el sistema nervioso central de los pollos

A.J. CHAVES^{1,2}, J. VERGARA-ALERT¹, N. BUSQUETS¹, R. VALLE¹, R. RIVAS¹, R. DOLZ¹, A. RAMIS^{1,2}, A. DARJI¹, N. MAJÓ^{1,2,*}.

¹ Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193. Bellaterra, Barcelona, España.

² Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193. Bellaterra, Barcelona, España.

Correspondencia: *natalia.majo@cresa.uab.cat

RESUMEN

Los virus de influenza aviar de alta virulencia (IAAV) causan una enfermedad sistémica en los pollos, que frecuentemente provoca lesiones en el sistema nervioso central (SNC). En estudios previos se ha determinado que la rápida diseminación del virus es debido a la inducción de viremia y alteraciones en el endotelio capilar donde el virus se replica abundantemente (Chaves et al., 2011). Sin embargo, el mecanismo de entrada y diseminación del virus en el SNC no ha sido investigado. Con el objetivo de estudiar el mecanismo de neuroinvasión de un virus de IAAV, pollos libres de patógenos específicos fueron inoculados con una cepa H7N1 de IAAV. Se tomaron muestras de sangre desde las 6 hasta las 48 horas post-infección (hpi) para precisar el tiempo exacto de inicio de la viremia. Así mismo, el mecanismo de entrada del virus en el SNC fue determinado por medio de una técnica de perfusión intracardiaca con azul de Evans, el cual funciona como marcador de daño de la barrera hematoencefálica (del Valle et al., 2008). La distribución topográfica del virus en el SNC durante los primeros cuatro días post-inoculación (dpi) y de sus receptores de ácido siálico en el SNC fueron estudiados usando diferentes técnicas de inmunohistoquímica. Los resultados del estudio mostraron la presencia de RNA viral a partir de las 18 hpi en sangre. Así mismo, se pudo comprobar que el virus induce daño en la barrera hematoencefálica, ya que se pudo observar zonas de extravasación del azul de Evans asociadas con presencia de virus. El antígeno viral se observó ampliamente distribuido en el SNC a las 36 y 48 hpi. Los receptores de tipo aviar (Siaα2,3Gal) y humano (Siaα2,6Gal) estaban presentes en las células endoteliales. Consecuentemente se puede aseverar que el virus H7N1 IAAV se disemina muy temprano vía hematogena, y favorecido por la presencia de abundantes receptores en las células endoteliales del SNC entra en este sistema a través de la disrupción de la barrera hematoencefálica en estadios iniciales de la infección.

Palabras clave: virus de influenza aviar de alta virulencia (IAAV); sistema nervioso central (SNC); barrera hematoencefálica.

ABSTRACT

Highly pathogenic avian influenza viruses (HPAIV) cause a very severe systemic disease in chickens, in which is also frequent to find central nervous system (CNS) lesions. Previous studies indicate that the virus could be rapidly disseminated thanks to the abundant replication on endothelial cells and the production of viremia. However, the exact mechanism for virus entry and dissemination in the CNS has not been truly investigated. Then, the aim of this study was to determine the mechanism of neuroinvasion of a H7N1 HPAIV in the central nervous system of specific pathogen free chickens. Blood samples were collected every 6 hours, and from 6 until 48 hours post inoculation (hpi) to precisely ascertain the beginning of the viremia. Likewise, the induction of blood brain barrier (BBB) disruption by the virus was studied by means of the intracardial perfusion of Evans blue, which served to label the areas of extravasion and damage of the BBB. Besides, the topographical distribution of the virus and

presence of influenza virus receptors in the CNS was investigated using different immunohistochemistry (IHC) techniques. In this manner, it was proved that this H7N1 HPAIV strain produced viremia as early as 18 hpi. Besides, the virus was able to induce disruption of the BBB, demonstrated for the detection of Evans blue extravasation at 36 and 48 hpi. In addition, the presence of virus in areas of extravasation let us to indicate that this disruption might be induced directly by the virus. Furthermore, the study of the topographical distribution of the H7N1 HPAIV from 1 to 4 dpi, enabled us to potentially discard the use of the olfactory bulb or other cranial nerves route as a pathway for virus entry into the CNS of chickens. The presence of both receptors in the endothelial cells corroborates their important role as virus acceptor and site for virus replication. In summary, it can be asserted that this H7N1 HPAIV strain disseminates via the hematogenous route very early during the infection, maybe, it could be favoured by the presence of abundant receptors on the CNS endothelial cells. This factor is also determining for the ability of this H7N1 HPAIV to disrupt the BBB during the first hours of infection.

Keywords: highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV); central nervous system (CNS); blood brain barrier (BBB).

INTRODUCCIÓN

Los virus de la influenza (VI) son importantes patógenos que infectan un amplio rango de especies aviares y de mamíferos a nivel mundial (Suarez, 2008). En las aves, los virus de influenza aviar (VIA) producen una gran variedad de síntomas, clasificándose de esta manera como virus de influenza de baja virulencia (IABV) y VIA de alta virulencia (IAAV) (Swayne & Patin-Jackwood, 2008).

En una gran cantidad de estudios de infecciones por virus IAAV, se describen lesiones en el SNC, siendo uno de los sitios primarios de replicación viral en las aves (Kobayashi *et al.*, 1996; Swayne, 2007). Se ha hipotetizado que los VI pueden usar diferentes mecanismos para ingresar al SNC, tales como: transporte retrogrado a través del sistema nervioso periférico (Matsuda *et al.*, 2005), vía el nervio olfatorio (Park *et al.*, 2002), o través del flujo sanguíneo (Mori & Kimura, 2001).

Los VI se han estudiado ampliamente utilizando como modelo el ratón, donde el virus utiliza los nervios craneales y periféricos para llegar al SNC (Mori & Kimura, 2001; Park *et al.*, 2002). Por lo contrario, en las aves se han hecho pocos estudios, pero se ha visto que el VI causa viremia y además se cree que uno de los factores principales que determina la entrada y diseminación en el SNC sería el daño del endotelio capilar (Kobayashi *et al.*, 1996; Feldmann *et al.*, 2000). De hecho, se ha observado tanto en infecciones naturales como experimentales, que existe una asociación entre la severidad de la lesión y la afinidad del virus por las células endoteliales en tejidos específicos (Van Riel *et al.*, 2009).

El objetivo de este estudio fue determinar el mecanismo de entrada de un virus H7N1 de IAAV en el SNC de las aves, así como, conocer cuáles son las células implicadas en la entrada del virus y establecer los factores celulares que afectan el tropismo viral. Con estos propósitos, se tomaron muestras de sangre en pollos libres de patógenos específicos desde las 6 hasta las 48 horas post-inoculación (hpi), así mismo, estos animales fueron perfundidos intracardialmente con el colorante azul de Evans. Este colorante sirvió como marcador del daño en la barrera hematoencefálica, para así determinar el tiempo exacto de entrada del virus en el SNC. La cronología y topografía de distribución del antígeno viral para este virus de IAAV fue establecida en pollos desde 2 hasta 4 dpi. De la misma forma, la presencia de receptores para el virus de la influenza aviar en el SNC de los pollos fue determinada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus

El virus de influenza aviar utilizado en este estudio corresponde a un virus de IAAV H7N1 A/chicken/Italy/5093/99, obtenido de un sexto pasaje proveído por la Dra. Ana Moreno del *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell' Emilia Romagna* in Brescia, Italia. El índice de patogenicidad intravenosa de este virus es de 2.8, indicando la alta virulencia de la cepa.

Diseño experimental

Sesenta y dos huevos embrionados libres de patógenos específicos, fueron incubados, nacidos y luego mantenidos en aisladores con presión negativa y bajo condiciones de bioseguridad del nivel 3 en el *Centre de Recerca en Sanitat Animal* (CRESA). A los 15 días de edad, los pollos fueron divididos al azar en cuatro grupos. Un primer grupo, de dieciocho pollos, fué utilizado para estudiar la estabilidad de la BBB a diferentes horas post-inoculación con el virus H7N1 A/Chicken/Italy/5093/99 (10^6 ELD₅₀). Estos animales recibieron una perfusión intracardiaca con el colorante fluorescente de azul de Evans. En estos animales se tomaron muestras de sangre y del cerebro cada 6 h hasta las 48 hpi. Un segundo grupo, de diecisiete pollos, fué infectado con el mismo virus H7N1 para estudiar la distribución topográfica viral desde el día 1 hasta el día 4 pi. En este grupo, tres pollos fueron eutanasiados cada día y se tomaron muestras de cerebro que se fijaron en formalina. Además, los pollos infectados y hallados muertos fueron incluidos en estudio. Adicionalmente, se utilizaron dos grupos control de 15 y 12 animales en los cuales se realizaron los mismos procedimientos que para el grupo 1 y 2, respectivamente.

Obtención de muestras y procesamiento para el estudio de la estabilidad de la barrera hematoencefálica

Para estudiar la estabilidad de la barrera hematoencefálica, tres pollos fueron perfundidos intracardialmente a las 6, 12, 18, 24, 36, y 48 hpi. Para realizar la perfusión, los pollos fueron anestesiados profundamente con 80 mg/kg de pentobarbital sódico. Una vez que se comprobaba la pérdida de sensibilidad profunda, se procedió a la apertura de la cavidad celómica y la perfusión intracardiaca utilizando un sistema dependiente de la gravedad. En total, la perfusión fue realizada con 50mL de solución tampón de fosfato salino (PBS) estéril y 50mL de solución de que contenía azul de Evans, preparada según previas descripciones (del Valle et al., 2008).

Después de la perfusión, el cerebro completo fue cuidadosamente diseccionado y fijado en paraformaldehído al 4% (15714, Electron Microscopy Science) por 12 hr. Posteriormente, las muestras fueron crio-protegidas en sacarosa al 30% por 24 hr (84097, Sigma-Aldrich Química, S.A.). Al finalizar la fijación, las muestras fueron cortadas en seis secciones coronales, que fueron embebidas en el crioprotector-OCT (OCT-Fast Frozen compound) (Tissue-Tek, Torrance, CA), y almacenadas a -80°C hasta su uso.

Obtención de muestras post-mortem para estudio de la distribución topográfica del virus

En el segundo grupo, se estudió la distribución topográfica del virus en muestras de cerebro fijadas en formol, embebidas en parafina y cortadas en seis secciones coronales para obtener muestras secuenciales de 3 μ m, de los siguientes interaurales a: 9.04mm, b: 6.64mm, c: 3.04mm, d: e1.60mm, f: -0.56mm, and g: -3.68mm (Figura 1) (Puelles et al., 2007). Estos cortes fueron utilizados para realizar todos los estudios de inmunohistoquímica (IHQ).

IHQ para detector antígeno viral en las secciones coronales del cerebro

Una técnica de IHQ para la detección de la nucleoproteína viral en secciones del cerebro fue realizada en los animales eutanasiados y en los pollos hallados muertos cada día de acuerdo con procedimientos previamente descritos (Rimmelzwaan et al., 2001; Chaves et al., 2011).

La distribución, intensidad y el patrón de tinción producto de la detección de antígeno del virus H7N1 de IAAV en el SNC de pollos en cada dpi, fue examinado en seis secciones coronales diferentes del cerebro. En cada sección se evaluó visualmente la intensidad y la extensión de la tinción asignándole luego una gradación. El sistema de clasificación implementado evaluaba el número de células positivas (incluyendo células endoteliales, astrocytos, oligodendrocitos, células de la microglia y del endotelio) en un campo utilizando el objetivo 10x del microscopio de luz. La intensidad de la tinción observada en las células endoteliales fue considerada por separado.

Inmuno-histoquímica con lectinas para la detección de los receptores del virus de la influenza en el SNC de los pollos

Las muestras de cerebro de pollos infectados eutanasiados o hallados muertos, y de los controles obtenidas desde el día 1 hasta 4 pi, fueron utilizadas para la detección de los receptores virales por

medio de una técnica de inmuno-histoquímica previamente descrita (Yao et al., (2008)) con algunas modificaciones menores. En forma breve, las secciones de cerebro de 3 mm de grosor, fueron incubadas con las lectinas biotiniladas *Sambucus nigra* (SNA) (10 mg/mL) o *Maackia amurensis leucoagglutinin* (MAAII) (15 mg/mL) (Vector laboratories Inc, CA, US) durante toda la noche a 4°C. Estas lectinas fueron utilizadas porque identifican los receptores de ácido siálico a los cuales se une el virus de influenza. En específico, la lectina MAAII fue usada para identificar las uniones α 2-3 del ácido siálico con los glicotopos (Sia α 2-3Gal), los cuales que son el sitio de unión de los virus de tipo aviar, mientras que la lectina SNA muestra preferencia por las uniones α 2-6 (Sia α 2-3Gal) a los cuales los virus humanos muestran preferencia (Shibuya et al., 1989).

Detección de RNA viral en la sangre de los pollos infectados con el virus H7N1 de IAAV por medio de RT-qPCR

La técnica de RT-qPCR usada para cuantificar las copias de RNA viral ha sido descrita previamente (Busquets et al., 2010). Brevemente, el RNA viral fue extraído de cada una de los muestra utilizando el mini kit QIAamp (Qiagen, Hilden, Germany). El RNA obtenido fue eluido en 40 μ l como volumen total y amplificado por medio de una one-step RT-qPCR, que detecta una región altamente conservada del gen de la matriz (*M*) del virus de influenza, usando cebadores previamente descritos (Spackman et al., 2003). En este procedimiento, se utilizó un control positivo interno para detectar los falsos negativos debido a inhibidores de la RT-qPCR.

RESULTADOS

Signos clínicos, mortalidad y lesiones macroscópicas

En el grupo 1, pollos utilizados para evaluar el estado de la barrera hematoencefálica por medio de la perfusión intravenosa de azul de Evans, no se observaron signos clínicos ni lesiones a ninguna hpi analizadas.

En el grupo 2, de estudio de la distribución topográfica del virus, no se observaron signos clínicos, ni lesiones macroscópicas el primer dpi. Por otro lado, el segundo dpi se pudo observar depresión, postración, plumas erizadas y dificultad respiratoria en ocho de 14 animales infectados. En la necropsia, solo se observó congestión pulmonar en dos de las tres aves evaluadas. El tercer dpi, cuatro pollos fueron hallados muertos, mientras que en los 11 restantes se observó signos de depresión severa e inactividad. Macroscópicamente, se observaron hemorragias petequiales en la piel sin plumas de las patas y la cresta, así como, en los músculos esqueléticos y el páncreas en dos de los tres pollos evaluados y en las aves halladas muertas. A los 4 dpi, uno pollo fue hallado muerto, mientras que en el resto se observó postración, disnea, y signos neurológicos de depresión profunda, temblores, y pérdida del balance. Las lesiones macroscópicas observadas incluyó: hemorragias petequiales y equimosis en las patas y la cresta, atrofia de la Bursa de Fabricio, hemorragias petequiales en la serosa del proventrículo, petequias y equimosis en el páncreas, así como palidez acentuada del riñón. No se observaron signos clínicos, mortalidad o lesiones macroscópicas en los pollos control de ambos grupos.

Detección de ARN viral en la sangre

El ARN viral fue detectado en la sangre a las 18 hpi en 2 de los ocho pollos evaluados (4,52 log₁₀ de ARN viral/mL). De la misma manera se pudo detectar niveles similares de ARN viral a las 24 hpi, en 3 de 8 pollos (4,72 log₁₀ copias de ARN viral/mL). Seguidamente, el número de pollos que mostraban viremia aumentó (6 de 8 animales fueron positivos), así mismo hubo un incremento en los niveles de virus detectado (5,60 log₁₀ de ARN viral/mL). Estos niveles llegaron a un pico de detección a las 48 hpi cuando se detectó en la totalidad de los 8 pollos evaluados (6,24 log₁₀ copias de ARN viral/mL).

Evaluación de la extravasación de azul de Evans en los cerebros de pollos infectados con el virus H7N1 de IAAV, en comparación con los animales control

No se observó evidencia de extravasación del colorante de azul de Evans en los pollos control a ninguna de las hpi evaluadas. En estos animales, se pudo observar presencia de colorante en el lumen de los vasos sanguíneos del parénquima del cerebro y las meninges. Similarmente, los pollos infectados con el virus H7N1

y perfundidos desde las 6 a las 24 hpi, muestran una tinción comparable con los pollos control, donde no se observa salida de colorante hacia el tejido alrededor de los vasos. La extravasación del azul de Evans en los pollos infectados pudo ser observada hasta las 48 hpi, como múltiples focos de extravasación y salida de colorante de azul de Evans fuera de los límites de los vasos sanguíneos hacia el parénquima del tejido.

Detección del virus de la influenza en tejidos perfundidos con azul de Evans

El antígeno del virus de la influenza fue observado en las zonas donde había extravasación por azul de Evans a las 48 hpi. Pero, regularmente el diámetro del halo de extravasación del azul de Evans era menor que la zona de positividad del virus. Al mismo tiempo, los focos de extravasación del azul de Evans fueron más numerosos, por lo que fue posible observar zonas de extravasación del azul de Evans donde no había presencia de antígeno viral. No se observó presencia de virus en animales perfundidos desde las 6 a las 24 hpi.

Lesiones histológicas y patrón de distribución topográfica del virus H7N1 IAAV en el sistema nervioso central de pollos infectados experimentalmente

No se observó presencia de virus en ninguna de las regiones del cerebro evaluadas en los animales infectados en el primer día post-infección. Posteriormente, en los días dos hasta cuatro pi, el antígeno viral se pudo detectar en las seis secciones coronales del cerebro, aunque con diferencias en la intensidad entre las diferentes regiones. En general la tinción fue más frecuentemente observada en la sustancia gris, y esporádicamente se observaron focos en la sustancia blanca. La tinción positiva para antígeno viral se observó como grupos de células y neuropilo formando focos individuales o múltiples que ocasionalmente se unían formando áreas positivas más extensas. Estos focos eran distribuidos al azar en el pallium telencefálico, subpallium, y striatum, y su distribución era variable entre cada animal. Por lo contrario, se observó una distribución simétrica y bilateral del antígeno en el mesencéfalo, hipotálamo, diencefalo, y rombencéfalo. En estas zonas el antígeno viral se observó restringido a núcleos neurales específicos. La tinción en el plexo coroideo fue escasa y se observó principalmente en el núcleo de las células.

De acuerdo con la distribución topográfica del virus se pudo observar que las regiones más rostrales del cerebro tienen menos antígeno en comparación con las secciones intermedia y caudal del cerebro de los pollos infectados con el virus H7N1. La intensidad de la tinción aumentó con el tiempo, llegando a alcanzar el máximo de intensidad a los 4 dpi. La tinción de las células endodimarias siempre fue más intensa que la tinción del plexo coroideo, mientras que las leptomeninges fueron negativas. Un nivel similar de tinción pudo ser observado en las células de los órganos circunventriculares (OCV), donde se observó una tinción débil a los 2 dpi y moderada a los 3 y 4 dpi.

Distribución de receptores para el virus de la influenza en el sistema nervioso de los pollos

Los receptores de tipo aviar (Siaα2-3Gal) fueron detectados en la superficie apical del plexo coroideo y las células endodimarias, así mismo, se observó una tinción leve en las células endoteliales. Los receptores de tipo humano (Siaα2-6Gal) fueron observados en el borde luminal de las células endoteliales del parénquima cerebral, el plexo coroideo y las meninges.

DISCUSIÓN

La neurovirulencia y neuroinvasividad de los VI han sido consideradas como uno de los factores principales que conducen a la alta mortalidad causada por esta enfermedad en las aves (Breithaupt et al., 2010). Sin embargo, pocos estudios se han realizado para determinar el mecanismo de daño del SNC inducido por el virus. Investigaciones previas han propuesto que los VI podrían utilizar tres posibles rutas, que serían: la hematogena (Kobayashi et al., 1996), la olfatoria (Mori et al., 2005) o vía otros nervios periféricos (Park et al., 2002).

En el presente estudio, se pudo observar que el virus H7N1 de IAAV, es capaz de invadir el torrente sanguíneo muy temprano durante la infección, ya que se detectó el antígeno viral a las 18 hpi. La viremia

temprana es común en la infección con virus de IAAV en las aves, como se ha observado en previas investigaciones (Kobayashi *et al.*, 1996; Toffan *et al.*, 2008; Chaves *et al.*, 2011). Además, se pudo comprobar por medio de una técnica de perfusión con el colorante de azul de Evans que el virus produce daño en la barrera hematoencefálica, en forma similar a como lo hacen otros virus que también inducen viremia, tales como el virus de la inmunodeficiencia de los simios, el virus del Sarampión, el citomegalovirus humano, el virus de la leucemia de células humano, y el virus del Nilo Occidental (Verma *et al.*, 2009).

La hipótesis de que el virus daña la barrera hematoencefálica muy temprano durante la infección es también sustentada, porque se pudo determinar por medio del estudio de la distribución topográfica del virus, que la infección por la vía olfatoria es poco probable. Esto debido a que las cantidades de antígeno viral fue escasa en el bulbo olfatorio y las regiones más craneales del cerebro. Así mismo, la utilización de los nervios craneales para el ingreso del virus al cerebro es remota, debido a que los núcleos neurales de nervios como el trigémino y el nervio vago, entre otros, muestran solo tinción leve y es esporádica durante los primeros dpi.

Por último, se pudo observar que las células endoteliales, las cuales se ha indicado que juegan un papel importante durante la diseminación y en la neuropatogénesis del virus (Perkins & Swayne, 2003; Swayne, 2007), muestran ambos tipos de receptores (Siaα2-3Gal y Siaα2-6Gal), corroborando el importante rol de dichas células en la patogénesis. Así mismo, este hallazgo sugiere que estas células son altamente permisivas a la replicación del virus, posiblemente su alteración y daño permiten que el virus ingrese en el SNC, ya que estas células son un importante componente de la barrera hematoencefálica.

En resumen, con este estudio se pudo determinar que el virus H7N1 de IAAV produce viremia muy temprano durante la infección, se disemina vía hematológica, se replica en las células endoteliales gracias a la presencia de abundantes receptores en estas células y daña la barrera hematoencefálica, lo cual fue comprobado porque se observa extravasación de colorante de azul de Evans a las 48 hpi.

REFERENCIAS

BREITHAUPT, A., KALTHOFF, D., DALE, J., BAIRLEIN, F., BEER, M. & TEIFKE, J. P. (2010). Neurotropism in blackcaps (*Sylvia atricapilla*) and red-billed queleas (*Quelea quelea*) after highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infection. *Veterinary Pathology Online*.

BUSQUETS, N., ABAD, F. X., ALBA, A., DOLZ, R., ALLEPUZ, A., RIVAS, R., RAMIS, A., DARJI, A. & MAJO, N. (2010). Persistence of highly pathogenic avian influenza virus (H7N1) in infected chickens: feather as a suitable sample for diagnosis. *J Gen Virol* **91**, 2307-2313.

CHAVES, A. J., BUSQUETS, N., CAMPOS, N., RAMIS, A., DOLZ, R., RIVAS, R., VALLE, R., ABAD, F. X., DARJI, A. & MAJÒ, N. (2011). Pathogenesis of highly pathogenic avian influenza A virus (H7N1) infection in chickens inoculated with three different doses. *Avian Pathology* **40**, 163-172.

DEL VALLE, J., CAMINS, A., PALLÀS, M., VILAPLANA, J. & PELEGRÍ, C. (2008). A new method for determining blood-brain barrier integrity based on intracardiac perfusion of an Evans Blue-Hoechst cocktail. *Journal of Neuroscience Methods* **174**, 42-49.

FELDMANN, A., SCHAFER, M. K. H., GARTEN, W. & KLENK, H.-D. (2000). Targeted infection of endothelial cells by avian influenza virus A/FPV/Rostock/34 (H7N1) in chicken embryos. *J. Virol.* **74**, 8018-8027.

KOBAYASHI, Y., HORIMOTO, T., KAWAOKA, Y., ALEXANDER, D. J. & ITAKURA, C. (1996). Neuropathological studies of chickens infected with highly pathogenic avian influenza viruses. *Journal of Comparative Pathology* **114**, 131-147.

MATSUDA, K., SHIBATA, T., SAKODA, Y., KIDA, H., KIMURA, T., OCHIAI, K. & UMEMURA, T. (2005). In vitro demonstration of neural transmission of avian influenza A virus. *J Gen Virol* **86**, 1131-1139.

MORI, I. & KIMURA, Y. (2001). Neuropathogenesis of influenza virus infection in mice. *Microbes Infect* **3**, 475-479.

MORI, I., NISHIYAMA, Y., YOKOCHI, T. & KIMURA, Y. (2005). Olfactory transmission of neurotropic viruses. *Journal of Neurovirology* **11**, 129-137.

PARK, C. H., ISHINAKA, M., TAKADA, A., KIDA, H., KIMURA, T., OCHIAI, K. & UMEMURA, T. (2002). The invasion routes of neurovirulent A/Hong Kong/483/97 (H5N1) influenza virus into the central nervous system after respiratory infection in mice. *Archives of Virology* **147**, 1425-1436.

PERKINS, L. E. L. & SWAYNE, D. E. (2003). Comparative susceptibility of selected avian and mammalian species to a Hong Kong-origin H5N1 high-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Dis.* **47**(3 Suppl), 956-967.

-
- PUELLES, L., MARTINEZ-DE-LA-TORRE, M., PAXINOS, G., WATSON, C. & MARTINEZ, S.** (2007). *The chick brain in stereotaxic coordinates: an atlas featuring neuromeric subdivisions and mammalian homologies*. Elsevier Inc New York.
- RIMMELZWAAN, G. F., KUIKEN, T., VAN AMERONGEN, G., BESTEBROER, T. M., FOUCHIER, R. A. M. & OSTERHAUS, A. D. M. E.** (2001). Pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection in a primate model. *J. Virol.* 75, 6687-6691.
- SHIBUYA, N., TAZAKI, K., SONG, Z., TARR, G. E., GOLDSTEIN, I. J. & PEUMANS, W. J.** (1989). A comparative study of bark lectins from three elderberry (*Sambucus*) species. *Journal of Biochemistry* 106, 1098-1103.
- SPACKMAN, E., SENNE, D. A., BULAGA, L. L., MYERS, T. J., PERDUE, M. L., GARBER, L. P., LOHMAN, K., DAUM, L. T. & SUAREZ, D. L.** (2003). Development of real-time RT-PCR for the detection of avian influenza virus. *Avian Diseases* 47, 1079-1082.
- SUAREZ, D. L.** (2008). Influenza A virus. In *Avian Influenza* ed. SWAYNE, D. E., pp. 3-22. Blackwell Publishing, Iowa.
- SWAYNE, D. E.** (2007). Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian Dis.* 51, 1., 242-249.
- SWAYNE, D. E. & PATIN-JACKWOOD, M.** (2008). Pathobiology of avian influenza virus infections in birds and mammals In *Avian Influenza*. ed. SWAYNE, D. E., pp. 87-122. Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
- TOFFAN, A., SERENA BEATO, M., DE NARDI, R., BERTOLI, E., SALVIATO, A., CATTOLI, G., TERREGINO, C. & CAPUA, I.** (2008). Conventional inactivated bivalent H5/H7 vaccine prevents viral localization in muscles of turkeys infected experimentally with low pathogenic avian influenza and highly pathogenic avian influenza H7N1 isolates. *Avian Pathology* 37, 407 - 412.
- VAN RIEL, D., VAN DEN BRAND, J. M. A., MUNSTER, V. J., BESTEBOER, T. M., FOUCHIER, R. A. M., OSTERHAUS, A. D. M. E. & KUIKEN, T.** (2009). Pathology and Virus Distribution in Chickens Naturally Infected with Highly Pathogenic Avian Influenza A Virus (H7N7) During the 2003 Outbreak in The Netherlands. *Veterinary Pathology Online* 46, 971-976.
- VERMA, S., LO, Y., CHAPAGAIN, M., LUM, S., KUMAR, M., GURJAV, U., LUO, H., NAKATSUKA, A. & NERURKAR, V. R.** (2009). West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. *Virology* 385, 425-433.
- YAO, L., KORTEWEG, C., HSUEH, W. & GU, J.** (2008). Avian influenza receptor expression in H5N1-infected and noninfected human tissues. *The FASEB Journal* 22, 733-740.