

KARAKTER VIRUS INFLUENZA SUBTIPE H7 DAN MEWASPADAI VIRUS INFLUENZA NOVEL H7N9

NLP Indi Dharmayanti dan Bahri S

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
nlpdharmayanti@yahoo.com

(Makalah masuk 26 Maret 2013 – Diterima 3 September 2013)

ABSTRAK

Virus influenza sub tipe H7 seperti halnya virus influenza lainnya terbagi menjadi dua *geographically genetic lineages* yang berbeda yaitu North American (H7N2, H7N3) atau Eurasian (H7N7 dan H7N3). Berbeda dengan virus AI sub tipe H5, sejak tahun 1997 sampai sekarang, semua infeksi yang disebabkan oleh virus H5, memiliki neuraminidase sub tipe 1. Virus AI sub tipe H7 yang sukses bertransmisi ke manusia mempunyai neuraminidase yang beragam, sehingga sepertinya sub tipe neuraminidase *compatible* dengan sub tipe H7. Pada unggas, virus AI sub tipe H7 biasanya menyebabkan *mild symptom*, meskipun terdapat juga beberapa wabah yang disebabkan virus sub tipe ini, sehingga tidak menyebabkan kepanikan dan kegiatan aktif surveilans untuk mengidentifikasi virus ini. Berbeda dengan virus H5N1 yang menimbulkan banyak kematian dan kerugian pada unggas yang terinfeksi virus H5N1, sehingga dapat teridentifikasi dengan cepat. Pada bulan April 2013, China melaporkan adanya infeksi virus Avian Influenza baru yaitu novel H7N9 yang mengakibatkan beberapa orang meninggal dunia. Dunia menjadi khawatir akan penyebaran virus H7N9 ke luar China, sehingga dibutuhkan kewaspadaan untuk dapat mengantisipasi penyakit ini termasuk Indonesia. Hasil analisis menunjukkan bahwa semua gen dari tiga virus tersebut adalah *avian origin*, dan merupakan virus *reassortment* yaitu enam gen internal dari virus AI A (H9N2) A/brambling/Beijing/16/2012, gen HA berasal dari A/duck/Zhejiang/12/2011 (H7N3), dan gen NA diduga berasal dari A/wildbird/Korea/A14/2011 (H7N9). Studi epidemiologi memperlihatkan bahwa 77% orang yang terinfeksi ini mengalami kontak langsung atau tidak langsung dengan hewan termasuk unggas ketika mengunjungi atau bekerja di pasar unggas hidup. Virus novel H7N9 juga ditemukan pada merpati, lingkungan dan ayam yang mempunyai kemiripan genetik dengan virus novel H7N9 yang menginfeksi manusia. Sampai Mei 2013, virus novel H7N9 belum teridentifikasi masuk ke Indonesia. Sebagai tindakan preventif, dikarenakan gejala yang ditimbulkan oleh virus H7N9 ini tidak terlihat (*mild symptom*) pada unggas sehingga diperlukan tindakan sebagai berikut: 1) Surveilans aktif (pasar tradisional, *backyard chicken* termasuk merpati); 2) Kebaruan metode diagnosis; 3) Studi *human-animal interface*; dan 4) Penelitian genom virus AI secara lengkap untuk mendeteksi virus-virus AI baru termasuk virus novel H7N9.

Kata kunci: Virus AI sub tipe H7, China, novel H7N9, virus reassortant

ABSTRACT

THE CHARACTER OF INFLUENZA VIRUS THE H7 SUBTYPE AND ALERT TO NOVEL INFLUENZA VIRUS H7N9 SUBTYPE VIRUS

Influenza virus sub tipe H7 influenza viruses as well as other influenza virus geographically divided into two distinct genetic lineages, North American (H7N2, H7N3) or Eurasian (H7N7 and H7N3). Unlike the AI virus sub types H5, since 1997 until now, all the infections caused by the H5 virus has Neuraminidase sub type 1 but H7 sub type of AI virus that transmitted successfully to humans have variety of Neuraminidase, so it seems compatible with H7 sub type. In poultry, the H7 sub type of AI virus typically causes mild symptoms, although there are also several outbreaks caused by this sub type virus, so it did not cause panic and active surveillance activities to identify this virus. It is very different from the H5N1 virus which caused many deaths and losses in poultry that infected with H5N1 virus so that it can be identified quickly. In April 2013, China reported a new AI virus is novel H7N9 which resulted in several people died. The world became aware of the H7N9 virus spreading to outside from China, it takes vigilance to be able to anticipate the disease, including Indonesia. Analysis of novel H7N9 virus showed that all genes of the virus is of avian origin, and the three other genes of the virus are reassortment from six internal genes of the AI virus A (H9N2) A/brambling/Beijing/16/2012, HA gene derived from A/duck/Zhejiang/12/2011 (H7N3), and NA genes thought to have come from A/wildbird/Korea/A14/2011 (H7N9). Epidemiological studies show that 77% of people infected by H7N9 have direct or indirect contact with animals including poultry when visiting or working in live poultry markets. Novel H7N9 virus was also found in pigeons, chickens, and environmental that have high genetic similarities with the novel H7N9 virus that infects humans. Until now (May 2013), a novel H7N9 virus has not been identified in Indonesia, so as a precaution and because the symptoms caused by the H7N9 virus is not visible (*mild symptom*) in poultry so that the necessary actions as follows: 1) Active surveillance (market traditionally, *backyard chicken* including pigeons), 2) Updating method of diagnosis, and 3) The study of human-animal interface, and 4) the study of AI complete virus genome to detect novel influenza viruses, including influenza H7N9 novel virus.

Key words: Sub type H7 of Avian Influenza virus, China, novel H7N9, virus reassortant

PENDAHULUAN

Virus influenza A subtipe H7 telah mengakibatkan lebih dari 100 kasus infeksi pada manusia sejak tahun 2002 di Belanda, Italia, Kanada, Amerika Serikat dan Inggris. Gejala klinis penyakit dari infeksi subtipe H7 antara lain adalah konjungtivitis, penyakit pernapasan ringan dan pneumonia. Infeksi subtipe H7 telah menghasilkan proporsi penyakit yang lebih kecil pada manusia (sakit rawat inap dan kematian) dibandingkan dengan yang disebabkan oleh subtipe H5N1. Akan tetapi, beberapa subtipe H7 lebih beradaptasi pada manusia berdasarkan sifat virus dan tingkat penyakit di kalangan orang-orang yang terinfeksi. Selain itu terjadi peningkatan isolasi virus influenza subtipe H7 dari unggas dan kemampuan subtipe ini dalam menyebabkan penyakit pada manusia. Sehingga perlunya pengawasan lanjutan dan karakterisasi virus ini.

Pada akhir Maret 2013, otoritas China mengumumkan telah mengidentifikasi virus influenza A novel H7N9 pada tiga orang dari Provinsi Anhui dan Shanghai (Chinese CDC 2013; WHO 2013). Dunia menjadi waspada akan penyebaran virus H7N9 ke luar China, sehingga dibutuhkan kewaspadaan untuk dapat mengantisipasi penyakit ini termasuk Indonesia. Kementerian Pertanian dan Kementerian Kesehatan harus melakukan koordinasi dalam melakukan aktif surveilans. Pada makalah ini akan dibahas tentang karakter virus influenza pada umumnya dan mengenal virus Avian Influenza subtipe H7 serta mewaspadai masuknya virus novel H7N9 ke Indonesia.

VIRUS AVIAN INFLUENZA

Virus Avian Influenza (AI) merupakan famili *Orthomyxoviridae*, mempunyai RNA bersegmen dan berorientasi negatif. Virus AI terbagi menjadi lima genera yaitu tipe A, B, C, Isavirus dan Thogotovirus. Virus influenza tipe A merupakan virus terpenting dan penyebarannya paling luas serta mampu menginfeksi berbagai spesies unggas dan mamalia. Virus influenza tipe B dan C adalah virus patogen pada manusia dan jarang menginfeksi spesies lainnya (Palese dan Shaw 2007). Kelompok Isavirus adalah patogen yang penting pada ikan seperti virus infeksius salmon anemia (Kibenge et al. 2004) sedangkan Thogotovirus adalah *tick-borne* arbovirus yang diisolasi dari manusia dan hewan ternak (Kuno et al. 2001). Virus influenza terdiri dari delapan segmen yang berbeda dan mengkode sedikitnya sepuluh protein virus. Protein struktural dalam virion yang matang (*mature*) dapat dibagi menjadi protein permukaan yaitu Hemagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), protein *membran ion channel* (M2) dan protein internal yang terdiri dari Nukleoprotein (NP), protein Matrix 1 (M1), protein

Polymerase Complex yaitu protein *Polymerase Basic* (PB1), *Polymerase Basic 2* (PB2), *Polymerase Acidic* (PA) (Palese dan Shaw 2007). Dua protein lainnya adalah protein nonstruktural 1 (NS1) dan nonstruktural 2 (NS2), yang juga disebut dengan *Nuclear Export Protein* (NEP) (O'Neill et al. 1998). Protein NS1 adalah protein yang tidak ditemukan pada partikel virus tetapi diproduksi dalam jumlah besar di sel inang (Birch-Machin et al. 1997; Tumpey et al. 2005). Protein NS2 umumnya ditemukan pada sel inang, namun dapat juga ditemukan pada virion (Palese dan Shaw 2007). Satu protein yang tidak ditemukan pada semua virus influenza tipe A yaitu protein PB1-F2, yang memiliki 87 asam amino yang ditranskripsi dari *open reading frame* alternatif dari protein PB1. Protein ini terlibat pada apoptosis dalam sel inang dan peran patogenesisnya masih diteliti (Chen et al. 2001). Penentuan subtipe virus influenza A berdasarkan pada dua permukaan protein yaitu hemagglutinin (H) dan neuraminidase (N) yang mengendalikan siklus hidup virus pada saat masuk dan keluarnya virus dari atau keluar sel. Semua subtipe virus influenza A dari H1-H16 dan N1-N9 dapat ditemukan pada unggas air, sedangkan H17N10 ditemukan pada kelelawar (Tong et al. 2012).

RESEPTOR VIRUS AVIAN INFLUENZA PADA INANG

Langkah awal infeksi virus adalah penempelan protein HA pada reseptor asam sialat sel inang. Asam sialat umumnya bentuk umum dari gula terminal pada N atau *O-linked glycoprotein* yang dibuat oleh beberapa turunan asam neuraminic. Molekul asam sialat biasanya diklasifikasikan sebagai ikatan gula dengan karbon α -2. Sebagian besar ikatannya dengan α -2,3 dan α -2,6 (Suzuki 2005). Perbedaan ikatan asam sialat menghasilkan konformasi yang berbeda dari reseptor inang yang akan berpengaruh pada penempelan virus. Hemagglutinin viral berdasar pada sekuen asam amino, mempunyai spesifisitas yang kuat terhadap ikatan α -2,3 atau α -2,6 dan hal ini dapat menjadi salah satu faktor dalam spesifisitas inang. Misalnya, hewan yang berbeda akan mempunyai perbedaan pada jaringan dan level ekspresi asam sialat α -2,3 dan α -2,6 dan menyebabkan virus influenza mempunyai preferensi kuat untuk asam sialat α -2,3 dan α -2,6. Sebagian besar virus hanya dapat secara efisien menginfeksi hewan yang mengekspresi kecenderungannya terhadap asam sialat. Asam sialat α -2,3 diekspresikan pada spesies unggas dan asam sialat α -2,6 diekspresikan pada manusia. Konformasi asam sialat tampak berkontribusi terhadap spesifisitas inang, namun tidak hanya satu faktor yang berkontribusi terhadap *species barrier*. Sebagai contoh, antara manusia dan beberapa jenis unggas seperti puyuh,

mengekspresikan kedua jenis asam sialat, meskipun dengan distribusi yang berbeda pada jaringan (Thompson et al. 2006; Wan dan Perez 2006). Distribusi reseptor dapat berpengaruh langsung pada patogenesis seperti yang ditunjukkan infeksi H5N1 pada manusia. Pneumonia umumnya dapat dilihat dan tidak terjadi infeksi pada saluran napas bagian atas. Patologi tersebut berkorelasi pada ekspresi asam sialat α -2,3 dalam sel alveolar type II di paru-paru (Shinya et al. 2006). Spesifitas reseptor asam sialat pada protein HA sebenarnya tidak mutlak, dan dapat berubah jika terjadi substitusi asam amino pada posisi 226 dan 228 (penomoran asam amino berdasar virus H3) (Connor et al. 1994; Vines et al. 1998). Perubahan asam amino pada dua posisi ini dapat menghasilkan perubahan besar dari fenotipe virus.

KASUS VIRUS INFLUENZA SUBTIPE H7 PADA UNGGAS DAN MANUSIA

Virus influenza sub tipe H7 seperti halnya semua virus influenza dibagi menjadi dua *geographically distinct genetic lineages* yaitu North American atau Eurasian (Banks et al. 2000). Wabah yang disebabkan oleh virus sub tipe H7 HPAI dan LPAI antara lain H7N1, H7N2, H7N3, H7N4 dan H7N7 telah mengakibatkan sekitar 75 juta unggas mati atau dimusnahkan (Capua dan Alexander 2004). Kasus pertama yang pernah dilaporkan adanya infeksi virus sub tipe H7 secara langsung dari unggas ke manusia terjadi pada tahun 1996 dengan gejala konjungtivitis pada wanita yang memelihara itik setelah sehari sebelumnya membersihkan kandang itik tersebut. Wabah terbesar infeksi virus H7 terjadi pada tahun 2003 di Belanda, yang menyerang peternakan ayam komersial dan telah menyebabkan sekitar 30 juta ayam dimusnahkan (Fouchier et al. 2004; Koopmans et al. 2004). Delapan puluh enam orang yang terlibat dalam proses *stamping out* dan tiga orang anggota keluarga dari mereka yang tidak pernah kontak dengan peternakan ayam terinfeksi dan terkonfirmasi secara virologi sebagai virus H7, sehingga terdapat dugaan telah terjadi transmisi dari manusia ke manusia secara terbatas (Koopmans et al. 2004). Manusia yang terinfeksi virus H7 ini sebanyak 78 orang mengalami konjungtivitis, lima orang konjungtivitis dan gejala saluran pernapasan, dua orang mempunyai gejala pernapasan dan satu orang dokter hewan yang mengunjungi beberapa peternakan ayam terinfeksi meninggal dunia (Koopmans et al. 2004). Beberapa wabah lainnya yang disebabkan oleh LPAI H7N3 terjadi di Italia Utara pada tahun 2002-2003, diindikasikan juga adanya pekerja peternakan yang terinfeksi oleh virus ini (Puzelli et al. 2005). Wabah pada peternakan unggas dikarenakan HPAI atau LPAI sub tipe H7 telah menyebabkan kerugian ekonomi di

Amerika. Virus LPAI H7N2 juga pernah dideteksi di pasar unggas hidup (CDC 2004a) dan infeksi virus H7N2 pada manusia juga pernah dilaporkan (CDC 2004b) yang berhasil diisolasi dari sampel saluran napas atas. Kasus lain adanya infeksi virus sub tipe H7 pada manusia dan unggas juga pernah dilaporkan seperti di Amerika (H7N3) tahun 2003 (Hirst et al. 2004), di Inggris (H7N3) tahun 2006 (Nguyen-Van-Tam et al. 2006).

SIFAT VIRUS INFLUENZA SUBTIPE H7

Seringnya pemberitaan dan banyaknya wabah yang menyebabkan kematian pada unggas di banyak negara dan kemampuannya dalam menimbulkan keparahan penyakit bahkan kematian pada manusia yang disebabkan oleh virus HPAI H5N1 sehingga menyebabkan ketakutan dunia akan terjadinya pandemi akibat virus H5N1. Dilain pihak, virus influenza sub tipe H7 mempunyai kemampuan yang sama dengan virus sub tipe H5 dan telah banyak menimbulkan wabah infeksi yang cukup besar pada manusia. Oleh karena itu, potensi dari virus influenza sub tipe H7 untuk menjadi virus pandemi sebaiknya tidak diabaikan sebab virus sub tipe H7 telah menyebabkan infeksi pada manusia, kematian dan transmisi dari manusia ke manusia meskipun masih terbatas (Koopmans et al. 2004; Abdel-Ghaffar et al. 2008; Belser et al. 2008). Hal yang menjadi perhatian adalah, meskipun virus influenza sub tipe H5N1 dimanifestasikan dengan penyakit pernapasan yang berat, manusia yang terinfeksi virus sub tipe H7 umumnya menyebabkan konjungtivitis dan infeksi saluran napas yang ringan. Meskipun secara keseluruhan perbedaan penyakit pada manusia adalah manifestasi dan derajat keparahan, virus sub tipe H7 dapat bereplikasi dengan efisien dalam saluran pernapasan hewan coba yang diinfeksi virus sub tipe H7 tanpa adaptasi terlebih dahulu, dan mempunyai kemampuan menyebar secara sistemik termasuk ke sistem syaraf pusat pada hewan coba mamalia (Spackman et al. 2003; de Wit et al. 2005).

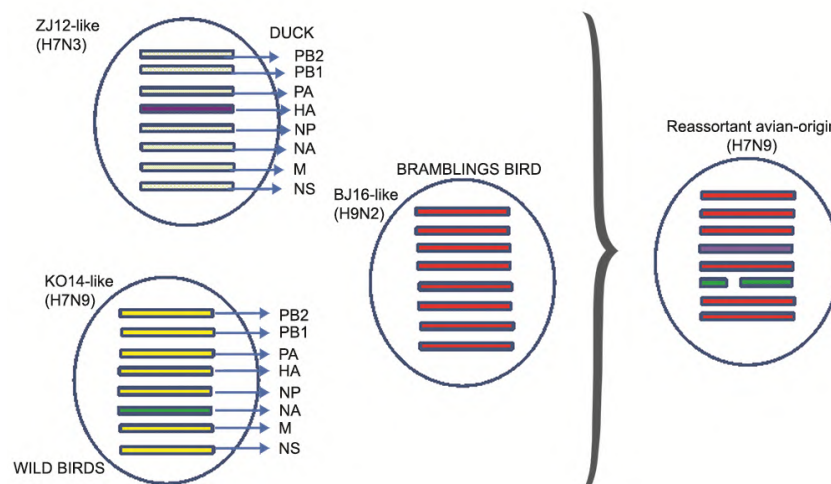
Virus sub tipe H7 dari *North American lineage* yang diisolasi pada tahun 2002-2003, secara parsial beradaptasi dengan asam sialat α 2-6, yang merupakan reseptor influenza manusia dan ditemukan pada saluran napas bagian atas (Belser et al. 2008) Hal yang sangat penting bagi transmisi virus influenza manusia adalah *binding* antara virus dan reseptor asam sialat yang berlokasi pada saluran napas bagian atas. Sehingga jika virus sub tipe H7 dari *North American lineage* ini beradaptasi lebih lanjut dan meningkat kemampuannya untuk beradaptasi dengan reseptor asam sialat α 2-6, virus AI ini berpotensi untuk dapat menyebar lebih efisien dari unggas ke manusia dan diantara manusia, meskipun belum dilaporkan adanya transmisi antar manusia yang diakibatkan virus ini (Belser et al. 2008).

Meskipun lebih dari 400 orang dipastikan terinfeksi virus subtipe H5 sejak tahun 1997, semua infeksi disebabkan oleh virus yang memiliki subtipe neuraminidase-nya adalah N1 (Abdel-Ghafar et al. 2008). Hal berbeda terjadi pada virus subtipe H7 yang mempunyai beragam subtipe neuraminidase dan sukses bertransmisi dari unggas ke manusia, yang menunjukkan bahwa berbagai subtipe neuraminidase kompatibel untuk virus subtipe H7. Kedua jenis virus tersebut subtipe H5N1 dan subtipe H7, keduanya dikaitkan dengan kejadian penyakit pada manusia. Keragaman yang cukup besar dari virus subtipe H7 yang dihubungkan dengan kejadian penyakit pada manusia, membutuhkan surveilans aktif pada orang yang terpapar virus subtipe H7 seperti pekerja peternakan ataupun keluarga dari para pekerja yang sakit setelah terjadinya wabah virus influenza subtipe H7. Kejadian konjungtivitis setelah infeksi virus subtipe H7, gejala klinis sakit tidak sering dihubungkan dengan infeksi dengan virus lainnya, sehingga dibutuhkan penelitian lebih mendalam untuk memahami rute virus masuk ke dalam tubuh manusia dan memproteksi manusia infeksi virus ini.

VIRUS AVIAN INFLUENZA NOVEL H7N9

Sporadic human infection oleh virus influenza A biasanya terjadi setelah adanya paparan dari unggas yang menyebabkan rentang sakit mulai dari konjungtivitis dan infeksi saluran atas sampai pneumonia dan kegagalan multiorgan. Infeksi virus *Avian Influenza Low Pathogenic* (LPAI) seperti H7N2, H7N3, H9N2 atau H10N7 (Hirst et al. 2004; Nguyen-Van-Tam et al. 2006; Arzey et al. 2012) telah menyebabkan infeksi saluran napas ringan (konjungtivitis) atau penyakit saluran napas moderat.

Namun pada akhir Maret 2013, otoritas China mengumumkan telah mengidentifikasi virus influenza A novel H7N9 pada tiga orang dari Provinsi Anhui dan Shanghai (Chinese CDC 2013; WHO 2013). Lebih lanjut, Gao et al. (2013) dalam publikasinya melaporkan bahwa pada bulan Maret 2013, kasus infeksi manusia dengan pneumonia yang disebabkan karena infeksi virus H7N9 dan telah dibuktikan secara ilmiah. Gao et al. (2013) mengonfirmasi dengan cara *real-time* RT-PCR, isolasi virus, dan sekuensing genom penuh, bahwa ketiga pasien terinfeksi dengan novel *avian origin* influenza A (H7N9) virus dan negatif untuk influenza musiman virus (H1, H3 atau B), H5N1, SARS-COV dan HCoV-Erasmus Medical Center (EMC). Hasil identifikasi pasien menunjukkan hasil isolasi virus yaitu virus influenza A/Shanghai/1/2013 (H7N9), A/Shanghai/2/2013(H7N9), dan A/Anhui/1/2013 (H7N9). Sekuen nukleotida lengkap memperlihatkan tiga H7N9 influenza virus menunjukkan bahwa mereka 97,7-100% identik dalam semua delapan segmen gen. Analisis filogenetik dari semua gen dari isolat menunjukkan bahwa setiap gen berasal dari unggas (Gambar 1). Gen penyandi hemagglutinin (HA) mempunyai homologi tertinggi dengan A/duck/Zhejiang/12/2011 (H7N3, subtipe ZJ12). Pengkodean gen neuraminidase (NA) adalah protein yang paling dekat hubungannya ke A/Wildbird/Korea/A14/2011 (H7N9, subtipe KO14), namun gen HA dari H7N9 virus dalam tiga pasien tersebut sangat berbeda dari yang di virus KO14. Enam gen internal mempunyai homologi tertinggi dengan A/brambling/Beijing/16/2012- like virus (H9N2) (Gambar 1). Analisis filogenetik menunjukkan bahwa virus tersebut adalah *reassortant* virus. Sampai tanggal 17 Mei 2013 tercatat sebanyak 131 kasus terkonfirmasi H7N9 dan 36 orang diantaranya meninggal dunia (WHO 2013).



Gambar 1. Hipotesa *host* dan *lineage origin* segmen gen virus novel AI H7N9

Sumber: Gao et al. (2013)

Shi et al. (2013) dalam laporannya melakukan investigasi setelah pada tanggal 31 Maret 2013, *The National Health and Family Planning Commission* mengumumkan adanya infeksi H7N9 pada manusia di Provinsi Shanghai dan Anhui. Mereka mengoleksi 970 sampel meliputi air minum, tanah, *swab* trakea dan kloaka dari pasar unggas hidup (*live poultry market*) dan peternakan ayam di Provinsi Shanghai dan Anhui. Dua puluh sampel positif influenza H7N9 ditemukan dan semuanya berasal dari Provinsi Shanghai. Dari 20 isolat virus H7N9 yang data sekuen nukleotida virus yang masukkan di *The Global Initiative on Sharing All Influenza Data* (GISAID) hanya sebanyak tiga isolat yaitu (A/pigeon/Shanghai/S1069/2013; A/chicken/Shanghai/S1053/2013 dan A/environment/Shanghai/S1088/2013) yang datanya tersedia di GISAID. Analisis filogenetika memperlihatkan bahwa isolat dari pasar unggas tradisional mempunyai kedekatan yang tinggi dengan virus H7N9 asal manusia (Gambar 2 dan 3). Dari empat virus H7N9 asal manusia (A/Shanghai/1/2013; A/Shanghai/2/2013; A/Anhui/1/2013 dan A/Hangzhou/1/2013), dan tiga virus asal hewan (A/pigeon/Shanghai/S1069/2013; A/chicken/Shanghai/S1053/2013 dan A/environment/Shanghai/S1088/2013), Kageyama et al. (2013) melakukan analisis genetik dari ketujuh virus tersebut. Data sekuen nukleotida diperoleh dari pangkalan data GISAID (www.gisaid.org). Analisis filogenetika memperlihatkan bahwa ketujuh virus H7N9 menunjukkan kedekatan genetik yang tinggi yang mengindikasikan bahwa virus H7N9 telah bersirkulasi sebelumnya di unggas.

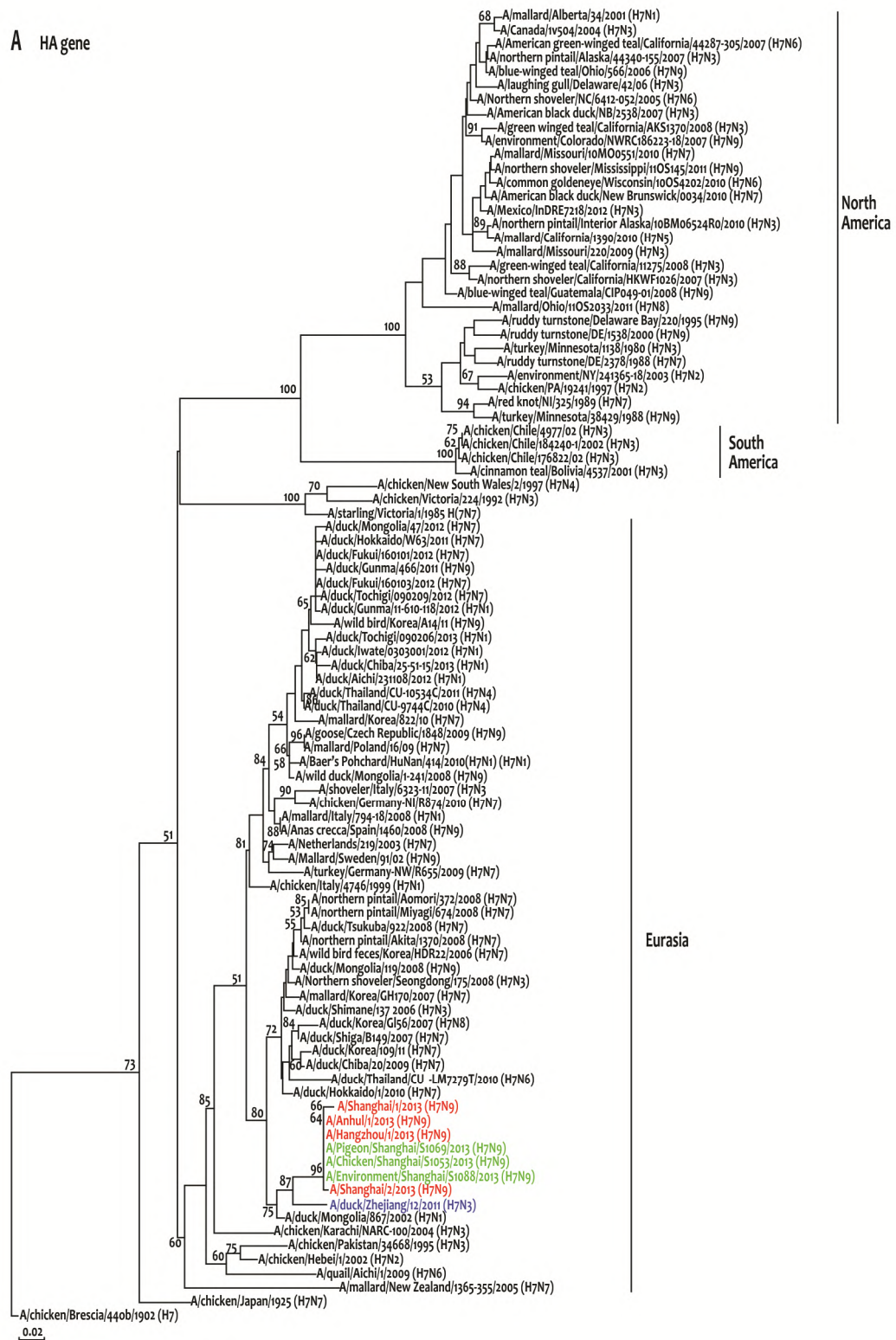
Gao et al. (2013) menganalisis bahwa empat virus asal manusia (A/Shanghai/1/2013; A/Shanghai/2/2013; A/Anhui/1/2013 dan A/Hangzhou/1/2013) mempunyai tempat pembelahan HA yang hanya memiliki asam amino tunggal R (arginin), menunjukkan efek patogenik rendah pada unggas (*low pathogenic*). Mutasi T160A diidentifikasi pada 150 loop (H3 penomoran) pada gen HA dari ketiga virus. Substitusi Q226L di 210 loop dalam HA gen ditemukan di kedua A/Anhui/1/2013 dan A/Shanghai/2/2013 virus tetapi tidak di A/Shanghai/1/2013 virus (Tabel 2). Lima asam amino pada protein NA mengalami delesi pada posisi 69-73. Protein M2 mengalami substitusi yaitu S31N, yang menunjukkan resistensi terhadap amantadin. Mutasi lain yaitu pada posisi L89V dan E627K di PB2 dan P42S di NS1 juga diidentifikasi (Tabel 2). Asam amino dalam virus A/Shanghai/1/2013, sedikit berbeda dengan virus A/Anhui/1/2013 dan A/Shanghai/2/2013, ditunjukkan pada Tabel 1. Pada Tabel 1 dapat ditunjukkan beberapa variabilitas yang diamati, seperti

Q226L di HA yang memperlihatkan peningkatan sensitivitas reseptor pada manusia. Pada protein NA memperlihatkan bahwa virus ini sebagian besar masih sensitif terhadap oseltamivir (R292K) dan resisten terhadap amantadin S31N. Pada protein PB2 juga memperlihatkan peningkatan virulensi pada mencit dikarenakan substitusi pada posisi E627K.

Shi et al. (2013) dalam analisisnya menunjukkan bahwa gen HA dari virus H7N9 asal unggas dan manusia tidak mempunyai *multiple basic amino acid* pada *cleavage site* yang sebenarnya merupakan penanda molekuler virus patogen/*highly pathogenic* virus influenza subtipe H5 dan H7 (Senne et al. 1996; Subbarao et al. 2003). Namun, infeksi manusia dengan H7N9 virus ini menyebabkan gejala parah dengan tingkat kematian yang cukup tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa virus H7N9 dapat bereplikasi pada manusia secara efisien, meskipun pada gen HA dianggap mempunyai patogenisitas yang rendah. Spesifisitas *reseptor-binding* yang merupakan determinan molekuler utama inang dari virus influenza. Asam amino pada posisi 226 dan 228 pada HA sangat penting untuk spesifisitas *reseptor-binding* virus influenza (Naeve et al. 1984; Chen et al. 2012; Zhang et al. 2012), dan mutasi Q226L dan G228S di HA meningkatkan afinitas pengikatan reseptor manusia yaitu α 2,6 *glycans sialylated* (Srinivasan et al. 2013).

Dua dari virus H7N9 asal manusia A/Anhui/1/2013 (H7N9) dan A/Shanghai/2/2013 (H7N9), dan tiga isolat virus H7N9 dari unggas dan lingkungan mempunyai residu leusin pada posisi 226, yang menyiratkan bahwa virus ini mungkin telah mengakuisisi sebagian dari spesifisitas *reseptor-binding* pada manusia. Residu 627K dan 701N dalam protein PB2 berkontribusi untuk replikasi dan transmisi virus AI dalam inang mamalia (Subbarao et al. 1993; Hatta et al. 2001; Li et al. 2005; Gao et al. 2009). Ketiga virus H7N9 asal unggas dan lingkungan memiliki residu 627E yang berarti *avian-like*.

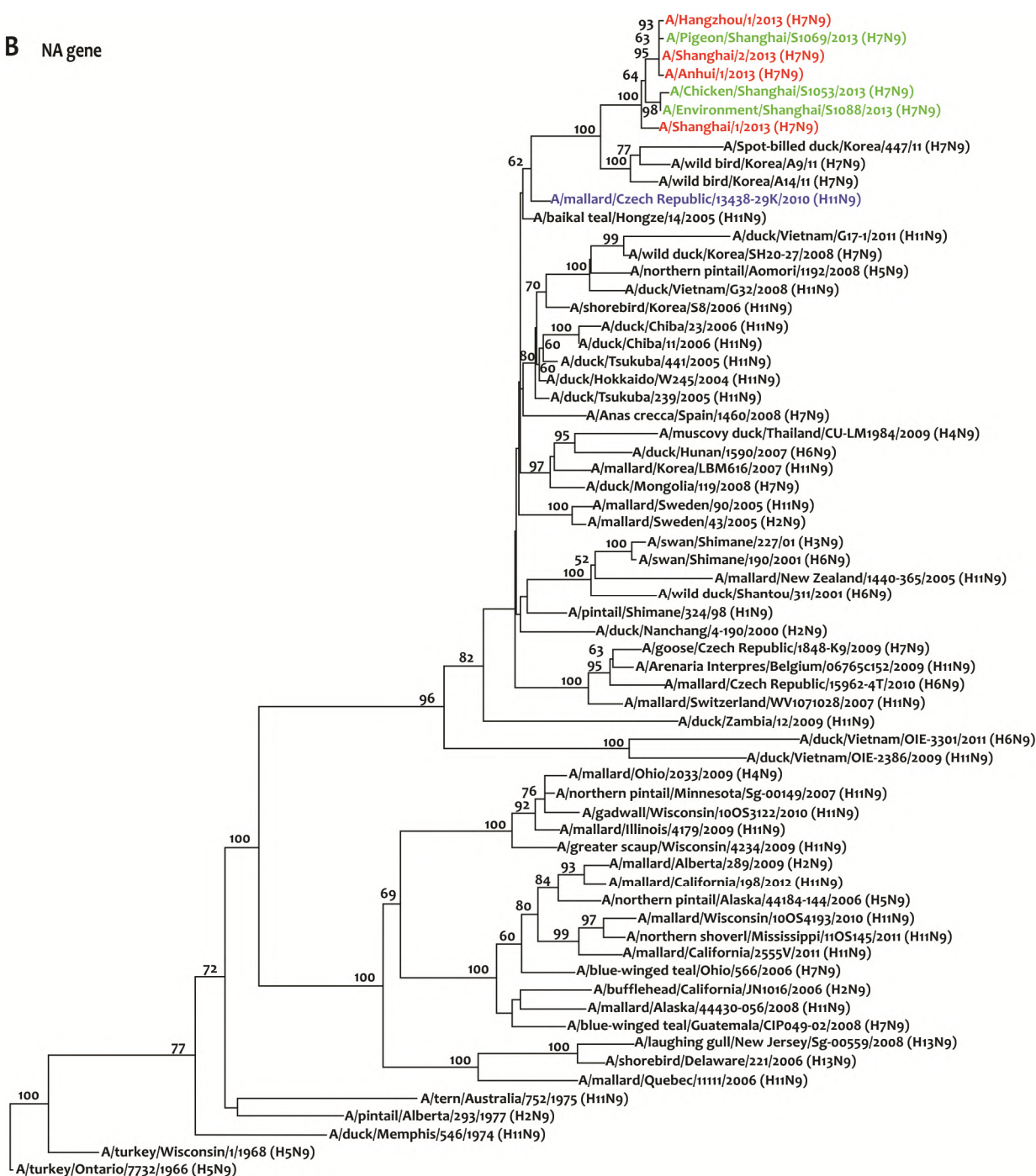
Sebaliknya, ketiga virus H7N9 asal manusia mengalami mutasi 627K protein PB2 mereka, yang mungkin telah memberikan kontribusi terhadap patogenisitas dan memetakan pada manusia. Protein NS1, dari virus novel H7N9 virus terpotong oleh stop kodon pada posisi 218, yang menciptakan delesi pada domain PDZ-binding protein domain, sebuah protein domain interaksi yang telah terlibat dalam patogenisitas virus 1918 dan sangat patogen pada virus H5N1 (Jackson et al. 2008). Protein PB1-F2 telah terbukti berhubungan dengan peningkatan patogenisitas virus 1918 dan sangat patogen pada virus H5N1 (Zamarin et al. 2006; Conenello et al. 2007).



Gambar 2. Pohon filogenetika gen HA virus AI subtipe H7. Virus berwarna merah adalah virus H7N9 asal manusia, sedangkan yang berwarna hijau adalah virus influenza subtipe H7N9 asal unggas/lingkungan

Sumber: Kageyama et al. (2013)

B NA gene



Gambar 3. Pohon filogenetika gen NA virus AI subtipe H7. Virus berwarna merah adalah virus H7N9 asal manusia, sedangkan yang berwarna hijau adalah virus influenza subtipe H7N9 asal unggas/lingkungan

Sumber: Kageyama et al. (2013)

Tabel 1. Analisis molekuler tiga isolat H7N9 asal manusia tahun 2013

Gen	Lokasi	Posisi	A/Shanghai/1/2013	A/Shanghai/2/2013	A/Anhui/1/2013
HA	<i>Cleavage Site</i> Posisi <i>Receptor Binding Site</i> (RBS) (Penomoran H3); Perubahan reseptor Q226L G228S Motif glikosilasi	Q G	PEIPKGR*G L G <i>Conserved</i> seperti virus subtipe H7	PEIPKGR*G L G <i>Conserved</i> seperti virus subtipe H7	PEIPKGR*G L G <i>Conserved</i> seperti virus subtipe H7
NA	<i>Stalk</i> Resistensi terhadap oseltamivir R294K	294	Delesi pada posisi 69-73 K	Delesi pada posisi 69-73 R	Delesi pada posisi 69-73 R
PB2	Memperkuat aktivitas polimerase dan meningkatkan virulensi pada mencit L89V E627K	89 627	V K	V K	V K
PB1	H5 virus <i>transmissible</i> pada feret H99Y I368V	99 368	H I	H V	H V
PB1-F2	<i>Full length</i>		90aa	90aa	90aa
M1	Meningkatnya virulensi pada mencit N30D T215A	30 215	D A	D A	D A
M2	Resistensi terhadap amantadin S31N	31	N	N	N
NS1	Meningkatnya virulensi pada mencit P42S	42	S	S	S

Sumber: Gao et al. (2013)

Dengan pengecualian dari protein PB1-F2 dari A/Pigeon/Shanghai/S1069/2013(H7N9), yang terpotong oleh stop kodon pada posisi 26, virus H7N9 lainnya dikodekan *full-length* pada protein PB1-F2. Selain itu, urutan asam amino dari protein M2 dari enam virus H7N9 asal manusia, unggas dan lingkungan mempunyai substitusi S31N yang merupakan karakteristik resistensi amantadine pada virus influenza (Saito et al. 2003; Shiraishi et al. 2003).

EPIDEMIOLOGI VIRUS AVIAN INFLUENZA NOVEL H7N9

Pada awal wabah virus novel H7N9, disebutkan belum jelas adanya paparan dari unggas atau hewan

hidup, namun Li et al. (2013) dengan kajian epidemiologi memperlihatkan bahwa dari 88 pasien yang terkonfirmasi terinfeksi virus H7N9, sebanyak 77 orang mempunyai riwayat kontak dengan hewan. Dari 77 orang ini sebanyak 59 (77%), dilaporkan 45 (76%) kontak dengan ayam, 12 (20%) dengan itik, dan 4 (7%) dengan babi. Paparan terjadi pada saat mereka bekerja atau mengunjungi pasar hewan hidup. Pada Tabel 2 memperlihatkan homologi yang tinggi antara virus H7N9 yang diisolasi dari hewan dan manusia.

Meskipun pasien yang terinfeksi virus H7N9, yang memiliki paparan dengan hewan tidak dapat diverifikasi tanpa pengujian yang ekstensif virus H7N9 pada hewan. Li et al. (2013) menduga tidak ada wabah hewan yang diidentifikasi di daerah dengan dikonfirmasi kasus H7N9 pada manusia, tetapi 77%

kasus terjadi dengan data yang tersedia pada pasien yang memiliki paparan dengan hewan hidup seperti unggas atau babi, selama kunjungan ke pasar hewan hidup. Hal ini menimbulkan kemungkinan zoonosis penularan virus H7N9 dari babi atau unggas ke manusia melalui kontak langsung atau melalui paparan lingkungan yang tercemar dengan babi atau unggas yang terinfeksi. Sebagai contoh adalah perilaku mengunjungi pasar unggas hidup, dimana virus AI dapat ditemukan telah diidentifikasi sebagai faktor risiko bagi infeksi virus H5N1 di Hongkong (Mounts et al. 1999) dan di perkotaan China (Yu et al. 2007; Zhou et al. 2009). Sehingga studi kasus kontrol diperlukan untuk mengidentifikasi faktor risiko infeksi virus H7N9.

Shi et al. (2013) memperlihatkan bahwa virus H7N9, secara simultan ditemukan pada ayam, merpati dan lingkungan di pasar unggas hidup dari Shanghai ketika infeksi manusia terjadi di Provinsi Shanghai dan Anhui, China. Virus H7N9 hanya terisolasi dari pasar unggas hidup dan tidak dari peternakan unggas, menunjukkan kemungkinan asal dari virus novel H7N9. Pasar unggas hidup tempat berkumpulnya secara bersama sejumlah burung dan spesies unggas dari sumber yang berbeda dengan situasi pasar dengan kepadatan tinggi, sehingga memberikan lingkungan yang ideal untuk *reassortment* antara virus AI dari subtype yang berbeda.

Selain itu, beberapa tanda molekuler diprediksi dan dihubungkan dengan adaptasi virus AI ke manusia sangat terlihat dalam virus novel H7N9. Mutasi pada residu 226L penting dalam situs *receptor-binding* protein HA juga yang terdapat pada virus H7N9 asal unggas dan lingkungan mungkin telah memfasilitasi infeksi dan replikasi dari virus novel H7N9 pada manusia. Namun yang penting adalah tiga virus H7N9 asal manusia H7N9 mengakuisisi mutasi 627K pada

protein PB2, selama mereka melakukan replikasi pada manusia, yang jelas berbeda dengan virus H7N9 asal unggas dan lingkungan. Hal ini menunjukkan bahwa virus novel H7N9 dapat beradaptasi dengan baik pada manusia. Bahkan, adaptasi dari virus H7N9 virus tampaknya lebih tinggi dari virus influenza H5N1, dikarenakan mutasi PB2 pada 627K lebih jarang terjadi daripada virus novel H7N9.

ANCAMAN VIRUS NOVEL H7N9

Dalam dekade terakhir, H7 virus AI telah menyebabkan wabah besar pada unggas domestik di seluruh dunia, sehingga kerugian ekonomi yang parah bagi industri unggas. Selama sirkulasi pada unggas, virus influenza H7 bisa langsung ditularkan dari unggas ke manusia dan menyebabkan penyakit (Kurtz et al. 1996; Banks et al. 1998; Tweed et al. 2004). Salah satu contoh adalah sangat patogen H7N7 influenza virus yang lazim pada unggas domestik di Belanda pada tahun 2003 (Koopmans et al. 2004). Wabah ini mengakibatkan penularan langsung virus influenza H7N7 untuk setidaknya 89 orang, dengan gejala konjungtivitis atau influenza ringan seperti penyakit dan satu kematian (Fouchier et al. 2004). Selain itu, sirkulasi yang rendah dari virus influenza H7 yang berpatogenesis rendah/*low pathogenic* pada unggas dapat mengakibatkan munculnya influenza yang sangat patogen virus melalui akuisisi beberapa asam amino dasar di tempat pembelahan pada protein HA, yang telah terjadi dengan virus influenza H7N1 selama wabah pada ayam dan kalkun di Italia (Capua et al. 2000). Saat ini, virus influenza novel H7N9 kekurangan berbagai asam amino esensial di tempat pembelahan HA tetapi bersifat patogen bagi manusia. Hal ini akan menjadi bencana jika virus ini mendapatkan berbagai asam amino esensial selama

Tabel 2. Homologi sekuen genom antara virus H7N9 dari pasar hewan hidup dan manusia

Gen	Homologi sekuen nukleotida (%)								
	A/pigeon/Shanghai/S1069/2013 (H7N9)			A/chicken/Shanghai/S1054/2013 (H7N9)			A/environment/Shanghai/S1054/2013 (H7N9)		
	A/Shanghai /1/2013	A/Shanghai /2/2013	A/Anhui /1/2013	A/Shanghai /1/2013	A/Shanghai /2/2013	A/Anhui /1/2013	A/Shanghai /1/2013	A/Shanghai /2/2013	A/Anhui /1/2013
HA	99,1	99,8	99,9	99,1	99,8	99,8	99,2	99,9	99,9
NA	99,3	99,9	99,9	99,3	99,3	99,3	99,4	99,5	99,5
PB2	99,5	99,8	99,9	99,6	99,8	99,9	99,6	99,9	100
PB1	96,5	96,7	96,8	99,4	99,9	99,9	99,4	100	100
PA	99,8	99,9	99,9	99,9	100	100	99,6	99,8	99,7
NP	97,7	98,8	98,8	97,6	100	100	99,6	100	100
M	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
NS	97,7	100	100	97,7	100	100	99,7	100	100

Sumber: Shi et al. (2013)

sirkulasi selanjutnya pada unggas dan manusia. Fitur baru virus H7N9 memiliki komposisi HA dan NA yang sebelumnya tidak dikenal. Virus novel H7N9 ini mempunyai kemampuan adaptif yang luar biasa pada manusia, dan berpotensi untuk memperoleh berbagai asam amino esensial di tempat pembelahan HA dan berkembang menjadi bentuk yang sangat patogen. Sehingga merupakan penyebab utama untuk permasalahan berkenaan dengan kesehatan masyarakat di seluruh dunia.

Disarankan untuk secepatnya diperkuat langkah-langkah pengendalian, seperti pengawasan berlanjutan di unggas dan manusia, pengendalian mobilitas hewan, penutupan pasar unggas hidup, desinfeksi pasar dan pemusnahan unggas di daerah yang terkena harus diambil selama tahap awal prevalensi virus untuk mencegah kemungkinan terjadinya pandemi. Hal ini juga penting adalah mengevaluasi patogenisitas dan transmisibilitas dari virus H7N9, dan untuk mengembangkan vaksin yang efektif dan antivirus untuk mengendalikan virus ini dan atau setidaknya mengurangi, jika tidak mungkin menghilangkan ancaman bagi kesehatan manusia.

UPAYA TINDAK LANJUT DI INDONESIA

Sampai bulan April 2013 (Dharmayanti et al. 2013 *unpublished*), di Indonesia belum teridentifikasi masuknya virus novel H7N9 ini dari China. Sebagai tindakan preventif, dikarenakan gejala yang ditimbulkan oleh virus H7N9 ini tidak terlihat (*mild symptom*) pada unggas sehingga diperlukan tindakan sebagai berikut:

- a) Surveilans aktif (pasar tradisional, ayam Kampung termasuk merpati).
- b) Pembaruan metode diagnosis (primer untuk mendeteksi virus novel H7N9 dengan metode *real time* atau RT-PCR konvensional dan lain-lain).
- c) *Human-animal interface*, misalnya dilakukan surveilans bersama antara Kementerian Pertanian dan Kementerian Kesehatan, dan koordinasi penelitian antara lembaga riset di kedua kementerian tersebut, perguruan tinggi atau lembaga lainnya.
- d) Penelitian genom virus AI secara lengkap untuk mendeteksi virus-virus AI baru termasuk virus novel H7N9.

KESIAPAN LEMBAGA RISET DALAM MENGIDENTIFIKASI VIRUS NOVEL H7N9

Deteksi dini merupakan hal yang harus segera dilakukan dalam mengidentifikasi *new emerging disease* seperti virus novel H7N9. Dikarenakan virus novel H7N9 adalah virus baru yang belum pernah ada sebelumnya, jika virus ini teridentifikasi di Indonesia, maka propagasi virus harus dilakukan oleh lembaga/institusi/lembaga riset yang mempunyai

fasilitas yang sangat memadai dalam melakukan riset-riset *new emerging* atau *re-emerging disease*, diantaranya adalah mempunyai Laboratorium Berkeamanan Tingkat III (Biosafety Level III, BSL-III) termasuk fasilitas *Animal BSL-3*, selain itu juga harus didukung dengan peralatan untuk penelitian genom virus seperti *DNA sequencer* atau *Next Generation Sequencing*. Selain itu, lembaga riset harus selalu melakukan monitoring sirkulasi virus AI setiap tahunnya jika AI masih menjadi ancaman pandemi. Karakterisasi genom virus AI harus dilakukan secara lengkap terhadap delapan gen, sehingga dapat diketahui dengan segera jika ada virus-virus AI baru atau yang mengalami mutasi. Hasil penelitian juga harus dikomunikasikan dan dikoordinasikan dengan Direktorat atau Kementerian terkait sehingga dengan cepat dapat dilakukan tindakan-tindakan pencegahan atau pemberantasannya.

KESIMPULAN

Virus AI H7N9 sangat berbeda dengan virus H5N1, karena virus H7N9 ataupun sebagian besar virus influenza subtipe H7 biasanya hanya menimbulkan gejala klinis yang ringan baik itu pada manusia ataupun hewan, hal ini sangat berbeda dengan virus H5N1 yang menimbulkan banyak kematian dan kerugian pada unggas yang terinfeksi virus H5N1 sehingga virus H5N1 dapat teridentifikasi dengan cepat. Kemandirian lembaga penelitian China dalam mengidentifikasi virus baru AI H7N9 dengan metode yang diterima oleh dunia internasional dan keterbukaan pemerintah China dalam mengumumkan virus baru ini ke dunia internasional menjadi pembelajaran dan menginspirasi banyak negara termasuk Indonesia. Lembaga penelitian sangat berperan penting dalam mendeteksi *new emerging diseases*, seperti virus influenza H7N9 dan virus-virus atau patogen lainnya yang masih merupakan penyakit eksotik di Indonesia. Peningkatan kemampuan dan kapasitas lembaga penelitian serta sumber daya manusia menjadi hal penting yang harus dilakukan dan harus disesuaikan dengan perkembangan ilmu pengetahuan serta teknologi terkini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd El-Ghafar AN, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Hayden FG, Nguyen DH, de Jong MD, Naghdaliyev A, Peiris JSM, Shindo N, Soeroro S, Uyeki TM. 2008. Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. *N Engl J Med.* 358:261-273.
- Arzey GG, Kirkland PD, Arzey KE, Frost M, Maywood P, Conaty S, Hurt AC, Deng Y-M, Iannello P, Barr I, Dwyer DE, Ratnamohan M, McPhie K, Selleck P. 2012. Influenza virus A (H10N7) in chickens and poultry abattoir workers, Australia. *Emerg Infect Dis.* 18:814-816.

- Banks J, Speidel E, Alexander DJ. 1998. Characterisation of an Avian Influenza A virus isolated from a human--is an intermediate host necessary for the emergence of pandemic influenza viruses? *Arch Virol.* 143:781-787.
- Banks J, Speidel EC, McCauley JW, Alexander DJ. 2000. Phylogenetic analysis of H7 haemagglutinin subtype influenza A viruses. *Arch Virol.* 145:1047-1058.
- Belser JA, Blixt O, Chen LM, Pappas C, Maines TR, Van Hoeven N, Donis R, Busch J, McBride R, Paulson JC, Katz JM, Tumpey TM. 2008. Contemporary North American influenza H7 viruses possess human receptor specificity: Implications for virus transmissibility. *Proc Natl Acad Sci.* 105:7558-7563.
- Birch-Machin I, Rowan A, Pick J, Mumford J, Binns M. 1997. Expression of the nonstructural protein NS1 of equine influenza A virus: detection of anti-NS1 antibody in post infection equine sera. *J Virol Methods.* 65:255-263.
- Capua I, Alexander DJ. 2004. Avian influenza: recent developments. *Avian Pathol.* 33:393-404.
- Capua I, Mutinelli F, Marangon S, Alexander DJ. 2000. H7N1 avian influenza in Italy (1999 to 2000) in intensively reared chickens and turkeys. *Avian Pathol.* 29:537-543.
- CDC. 2004a. Update: influenza activity-United States, 2003–04 season. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 53:284-287.
- CDC. 2004b. Update: influenza activity-United States and worldwide, 2003–04 season, and composition of the 2004-05 influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 53:547-552.
- Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdwl JW. 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med.* 7:1306-1312.
- Chen Z, Zhou H, Kim L, Jin H. 2012. The receptor binding specificity of the live attenuated influenza H2 and H6 vaccine viruses contributes to vaccine immunogenicity and protection in ferrets. *J Virol.* 86:2780-2786.
- Chinese CDC. 2013. Update-Human Infection with Avian Influenza A (H7N9) virus in China.
- Conenello GM, Zamarin D, Perrone LA, Tumpey T, Palese P. 2007. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. Kawaoka Y, editor. *PLoS Pathog.* 3:1414-1421.
- Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. 1994. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology.* 205:17-23.
- de Wit E, Munster VJ, Spronken MIJ, Bestebroer TM, Baas C, Beyer WEP, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. 2005. Protection of mice against lethal infection with highly pathogenic H7N7 influenza A virus by using a recombinant low-pathogenicity vaccine strain. *J Virol.* 79:12401-12407.
- Fouchier RAM, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SAG, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Van Doornum GJJ, Koch G, Bosman A, Koopmans M, Osterhaus ADME. 2004. Avian Influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci.* 101:1356-1361.
- Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, Chen J, Jie Z, Qiu H, Xu K, Xu X, Lu H, Zhu W, Gao Z, Xiang N, Shen Y, He Z, Gu Y, Zhang Z, Yang Y, Zhao X, Zhou L, Li X, Zou S, Zhang Y, Li X, Yang L, Guo J, Dong Jie, Li Qun, Dong L, Zhu Y, Bai T, Wang S, Hao P, Yang W, Zhang Y, Han J, Yu H, Li D, Gao GF, Wu G, Wang Y, Yuan Z, Shu Yuelong. 2013. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med.* 368:1888-1897.
- Gao Y, Zhang Y, Shinya K, Deng G, Jiang Y, Li Z, Guan Y, Tian G, Li Y, Shi J, Liu L, Zeng X, Bu Z, Xia X, Kawaoka Y, Chen H. 2009. Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 Avian Influenza viruses in a mammalian host. *PLoS Pathog.* 5:e1000709.
- Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y. 2001. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science.* 293:1840-1842.
- Hirst M, Astell CR, Griffith M, Coughlin SM, Moksa M, Zeng T, Smailus DE, Holt RA, Jones S, Marra MA, Petric M, Krajdén M, Lawrence D, Mak A, Chow R, Skowronski DM, Tweed SA, Goh S, Brunham RC, Robinson J, Bowes V, Sojony K, Byrne SK, Li Y, Kobasa D, Booth T, Paetzel M. 2004. Novel Avian Influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia. *Emerg Infect Dis.* 10:2192-2195.
- Jackson D, Hossain MJ, Hickman D, Perez DR, Lamb RA. 2008. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci.* 105:4381-4386.
- Kageyama T, Fujisaki S, Takashita E, Xu H, Yamada S, Uchida Y, Neumann G, Saito T, Kawaoka Y, Tashiro M. 2013. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. *Euro Surveill.* 18:20453.
- Kibenge FSB, Munir K, Kibenge MJT, Joseph T, Moneke E. 2004. Infectious salmon anemia virus: causative agent, pathogenesis and immunity. *Anim Health Res Rev.* 5:65-78.

- Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, Natrop G, van der Nat H, Vennema H, Meijer A, van Steenberg J, Fouchier R, Osterhaus A, Bosman A. 2004. Transmission of H7N7 Avian Influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet*. 363:587-593.
- Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Miller BR. 2001. Phylogeny of Thogotovirus. *Virus Genes*. 23:211-214.
- Kurtz J, Manvell RJ, Banks J. 1996. Avian Influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. *Lancet*. 348:901-902.
- Li Q, Zhou L, Zhou M, Chen Z, Li F, Wu H, Xiang N, Chen E, Tang F, Wang D, Meng L, Hong Z, Tu W, Cao Y, Li L, Ding F, Liu B, Wang M, Xie R, Gao R, Li X, Bai T, Zou S, He J, Hu J, Xu Y, Chai C, Wang S, Gao Y, Jin L, Zhang Y, Luo H, Yu H, Gao L, Pang X, Liu G, Shu Y, Yang W, Uyeki TM, Wang Y, Wu F, Feng Z. 2013. Preliminary report: Epidemiology of the Avian Influenza A (H7N9) outbreak in China. *N Engl J Med*. 1-11.
- Li Z, Chen H, Jiao P, Deng G, Tian G, Li Y, Hoffmann E, Webster RG, Matsuoka Y, Yu K. 2005. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *J Virol*. 79:12058-12064.
- Mounts AW, Kwong H, Izurieta HS, Ho Y, Au T, Lee M, Buxton BC, Williams SW, Mak KH, Katz JM, Thompson WW, Cox NJ, Fukuda K. 1999. Case-control study of risk factors for Avian Influenza A (H5N1) disease, Hongkong, 1997. *J Infect Dis*. 180:505-508.
- Naeve CW, Hinshaw VS, Webster RG. 1984. Mutations in the hemagglutinin receptor-binding site can change the biological properties of an influenza virus. *J Virol*. 51:567-569.
- Nguyen-Van-Tam JS, Nair P, Acheson P, Baker A, Barker M, Bracebridge S, Croft J, Ellis J, Gellertie R, Gent N, Ibbotson S, Joseph C, Mahgoub H, Monk P, Raghitt TW, Sundkvist T, Sellwood C, Simpson John, Smith J, Watson JM, Zambon M, Lightfoot N. 2006. Outbreak of low pathogenicity H7N3 Avian Influenza in UK, including associated case of human conjunctivitis. *Euro Surveill*. 11:E060504.2.
- O'Neill RE, Talon J, Palese P. 1998. The influenza virus NP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J*. 17:288-296.
- Palese P, Shaw ML. 2007. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication Vol. 2. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virol*. 5th. Philadelphia (Pennsylvania): Lippincott Williams & Wilkins; p. 1647-1689.
- Puzelli S, Di Trani L, Fabiani C, Campitelli L, De Marco MA, Capua I, Aguilera JF, Zambon M, Donatelli I. 2005. Serological analysis of serum samples from humans exposed to avian H7 influenza viruses in Italy between 1999 and 2003. *J Infect Dis*. 192:1318-1322.
- Saito R, Sakai T, Sato I, Sano Y, Oshitani H, Sato M, Suzuki H. 2003. Frequency of amantadine-resistant influenza A viruses during two seasons featuring cocirculation of H1N1 and H3N2. *J Clin Microbiol*. 41:2164-2165.
- Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, Pearson JE, Süß J, Lipkind M, Kida H, Webster RG. 1996. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 Avian Influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis*. 40:425-437.
- Shi J, Deng G, Liu P, Zhou J, Guan L, Li W, Li X, Guo J, Wang G, Fan J, Wang J, Li Y, Jiang Y, Liu L, Tian G, Li C, Chen H. 2013. Isolation and characterization of H7N9 viruses from live poultry markets-Implication of the source of current H7N9 infection in humans. *Chinese Sci Bull*. 58:1857-1863.
- Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. 2006. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*. 440:435-436.
- Shiraishi K, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, Goto H, Sugaya N, Kawaoka Y. 2003. High frequency of resistant viruses harboring different mutations in amantadine-treated children with influenza. *J Infect Dis*. 188:57-61.
- Spackman E, Senne DA, Davison S, Suarez DL. 2003. Sequence analysis of recent H7 Avian Influenza viruses associated with three different outbreaks in commercial poultry in the United States. *J Virol*. 77:13399-13402.
- Srinivasan K, Raman R, Jayaraman A, Viswanathan K, Sasisekharan R. 2013. Quantitative description of glycan-receptor binding of influenza A virus h7 hemagglutinin. *PLoS One*. 8:e49597.
- Subbarao EK, London W, Murphy BR. 1993. A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol*. 67:1761-1764.
- Subbarao K, Chen H, Swayne D, Mingay L, Fodor E, Brownlee G, Xu X, Lu X, Katz J, Cox N, Matsuoka Y. 2003. Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics. *Virology*. 305:192-200.
- Suzuki Y. 2005. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol Pharm Bull*. 28:399-408.
- Thompson CI, Barclay WS, Zambon MC, Pickles RJ. 2006. Infection of human airway epithelium by human and avian strains of influenza A virus. *J Virol*. 80:8060-8068.
- Tong S, Li Y, Rivaille P, Conrardy C, Castillo DAA, Chen L-M, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, Turmelle AS, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil MR, Tang K, Rowe LA, Sammons S, Xu X, Frace M, Lindblade KA, Cox NJ, Anderson LJ, Rupprecht CE, Donis RO. 2012. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci*. 9:4269-4274.

- Tumpey TM, Alvarez R, Swayne DE, Suarez DL. 2005. Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus. *J Clin Microbiol.* 43:676-683.
- Tweed SA, Skowronski DM, David ST, Larder A, Petric M, Lees W, Li Y, Katz J, Kraiden M, Tellier R, Halpert C, Hirst M, Astell C, Lawrence D, Mak A. 2004. Human illness from Avian Influenza H7N3, British Columbia. *Emerg Infect Dis.* 10:2196-2199.
- Vines A, Wells K, Matrosovich M, Castrucci MR, Ito T, Kawaoka Y. 1998. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. *J Virol.* 72:7626-7631.
- Wan H, Perez DR. 2006. Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses. *Virology.* 346:278-286.
- WHO. 2013. Human infection with Avian Influenza A (H7N9) virus—update. Writing committee of the second World Health Organization consultation on clinical aspects of human infection with Avian Influenza A (H5N1) virus [Internet]. [cited 20 Mei 2013]. Available from: <http://www.who.int>
- Yu HJ, Feng ZJ, Zhang XF, Xiang NJ, Huai Y, Zhou L, Li ZJ, Xu CL, Luo HM, He JF, Guan XH, Yuan ZG, Li YT, Xu LS, Hong RT, Liu XC, Zhou XY, Yin WW, Zhang SX, Shu YL, Wang MW, Wang Y, Lee CK, Uyeki TM, Yang WZ. 2007. Human influenza A (H5N1) cases, urban areas of People's Republic of China, 2005-2006. *Emerg Infect Dis.* 13:1061-1064.
- Zamarin D, Ortigoza MB, Palese P. 2006. Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol.* 80:7976-7983.
- Zhang Y, Zhang Q, Gao Y, He X, Kong H, Jiang Y, Guan Y, Xia X, Shu Y, Kawaoka Y, Bu Z, Chen H. 2012. Key molecular factors in hemagglutinin and PB2 contribute to efficient transmission of the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *J Virol.* 86:9666-9674.
- Zhou L, Liao Q, Dong L, Huai Y, Bai T, Xiang N, Shu Y, Liu W, Wang S, Qin P, Wang M, Xing X, Lv J, Chen RY, Feng Z, Yang W, Uyeki TM, Yu H. 2009. Risk factors for human illness with avian influenza A (H5N1) virus infection in China. *J Infect Dis.* 199:1726-1734.