

IDENTIFIKASI VIRUS *REASSORTANT* H5N1 CLADE 2.3.2.1C DARI OUTBREAK *HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA* PADA UNGGAS DI INDONESIA TAHUN 2015-2016

Hendra Wibawa¹, Rama Dharmawan¹, Herdiyanto Mulyawan¹, Trian Mahawan²,
Eko A Srihanto³, Yuli Miswati⁴, Nensy M Hutagaol⁵, Arif Riyadi⁶, Dinar H.W. Hartawan⁷,
Ferra Hendrawati⁸, Deswarni⁹, Farida C Zenal¹⁰, Nining Hartaningsih¹⁰, Bagoes Poermadja¹.

¹ Balai Besar Veteriner Wates, ² Balai Veteriner Subang, ³ Balai Veteriner Lampung,

⁴ Balai Veteriner Bukittinggi, ⁵ Balai Veteriner Medan, ⁶ Balai Veteriner Banjarbaru,

⁷ Balai Besar Veteriner Denpasar, ⁸ Balai Besar Veteriner Maros,

⁹ Balai Kesehatan Hewan dan Ikan Jakarta, ¹⁰ FAO Indonesia, Jakarta

Korespondensi penulis pertama: hendra.wibawa@pertanian.go.id

ABSTRAK

Salah satu sifat virus avian influenza (AI), termasuk virus dari kelompok ganas atau *highly pathogenic* AI (HPAI) subtipe H5N1, adalah kemampuan untuk terus berubah melalui mekanisme mutasi (*mutation*) dan persilangan/reasorsi (*reassortment*) genetik. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi virus-virus H5N1 terkini dengan pendekatan *whole genome sequencing* dan analisis bioinformatika virus AI. Teknik *Next Generation Sequencing* (NGS) digunakan untuk sekuensing sampel-sampel yang dikoleksi oleh Balai Besar Veteriner/Balai Veteriner di seluruh Indonesia dari kasus kematian unggas yang meningkat dari Desember 2015-April 2016. Hasil sekuens penuh (*full-length*) genom virus AI (terdiri dari 8 segmen: PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, MP, NS) diblast dalam database genom influenza di Genbank, dilanjutkan analisa filogenetik, dan karakterisasi asam-asam amino yang berperan dalam patogenesis virus HPAI. Hasil studi menunjukkan bahwa reasorsi genetik teridentifikasi pada beberapa segmen gen internal (PB2, M dan NS) dari virus H5N1 yang saat ini dominan ditemukan pada unggas di Indonesia (clade 2.3.2.1) dengan virus H5N1 yang dideteksi sebelumnya (clade 2.1.3.2). Selain itu juga terdeteksi adanya virus-virus reassortant HPAI H5N1 Clade 2.3.2.1 yang memiliki segmen gen internal PB2 yang diduga berasal dari virus *low pathogenic* AI (LPAI). Hasil ini mengindikasikan adanya sirkulasi bersama beberapa virus AI dari jenis clade dan subtipe yang berbeda-beda sebelum terjadi peningkatan outbreak HPAI pada awal 2016, yang berdampak terjadinya infeksi campuran (*co-infection*) pada satu spesies inang sehingga menghasilkan virus-virus reassortant. Surveilans pada aras molekuler sangat dibutuhkan untuk terus memonitor perkembangan evolusi virus AI di Indonesia

Kata Kunci: Avian influenza, clade 2.3.2.1c, *reassortment*, *whole genome sequencing*, NGS.

PENDAHULUAN

Indonesia adalah salah satu negara di Asia yang masih melaporkan outbreak penyakit *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) H5N1 ke badan/ organisasi kesehatan hewan dunia atau *Office International des Epizooties* (OIE) sejak Januari 2014. Virus H5N1 clade 2.1 teridentifikasi pada awal outbreak penyakit HPAI pada unggas di tahun 2003 (Vijaykrishna *et al.*, 2008). Golongan virus ini berkembang dan berevolusi menjadi beberapa galur (*sublineage*) virus dengan clade 2.1.3.2 dominan ditemukan pada unggas dan beberapa kasus pada manusia sampai tahun 2013 (WHO/OIE/FAO Working Group, 2014). Tetapi, sebuah strain baru H5N1, yaitu clade 2.3.2.1c, berhasil dideteksi dari outbreak penyakit HPAI pada peternakan-peternakan itik di Jawa Tengah dan Jawa Timur pada bulan Agustus-September 2012 (Wibawa *et al.*, 2012). Dalam kurun waktu 2013-2014, kedua golongan virus, clade

2.1.3.2 dan clade 2.3.2.1c, terdeteksi dan terisolasi dari kegiatan monitoring dan surveilan baik pada unggas dan pasar unggas hidup di Indonesia (FAO, 2014).

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan karakterisasi virus-virus HPAI H5N1 terkini yang dikoleksi/isolasi dari kasus-kasus kematian unggas yang terjadi di berbagai daerah di Indonesia tahun 2015-2016. Pendekatan studi *whole genome sequencing* dengan teknik *next generation sequencing* (NGS) digunakan untuk melihat susunan atau sekuens gen masing-masing segmen virus AI (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M dan NS). Penelitian ini berhasil mendeteksi dan mengidentifikasi adanya reassorsi genetik antar kelompok/clade (*inter-lineage*) atau antar sub tipe (*inter-subtype*) virus-virus HPAI (H5N1) clade 2.3.2.1c di Indonesia.

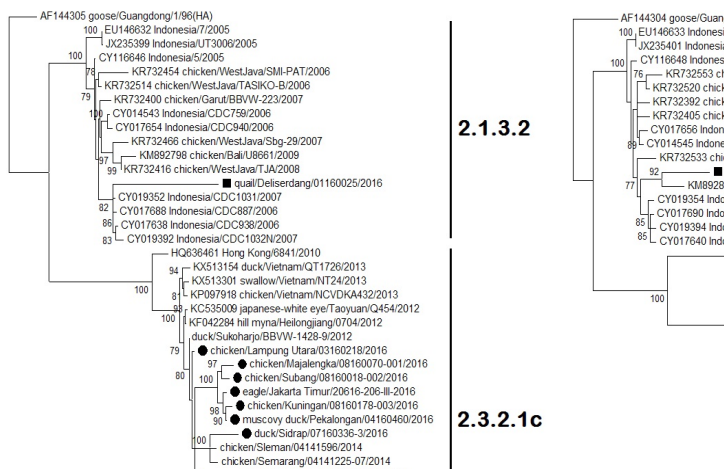
MATERI DAN METODE

Sebanyak 17 sampel organ dan 4 sampel swabs oropharyngeal dikoleksi dari 21 jenis bangsa burung/unggas (ayam, itik, entok, puyuh, dan elang) dari letupan kasus penyakit AI yang terjadi pada peternakan komersial kecil-menengah (sektor 3) dan peternakan backyard (sektor 4) di Jawa, Sumatra, Sulawesi, dan Bali dari bulan Desember 2015-April 2016. Karakterisasi virus AI dilakukan mengikuti prosedur monitoring virus influenza (*Influenza Virus Monitoring/IVM*) yang telah dipublikasi sebelumnya (Hartaningsih *et al*, 2015). Sampel-sampel dari lapangan diambil dari unggas yang menunjukkan sakit/mati dan dikirim ke BBVet/BVet atau Laboratorium Kesehatan Hewan tingkat propinsi di Jakarta untuk konfirmasi dan deteksi cepat menggunakan uji real-time *real-time reverse transcription-PCR* (RT-PCR) yang telah terstandarisasi (Hartaningsih *et al*, 2015). Sampel yang menunjukkan positif Influenza A sub tipe H5 dengan nilai *cycle threshold* (Ct) < 28 dari tiap laboratorium selanjutnya dikirim ke Laboratorium Rujukan Nasional penyakit AI, BBVet Wates, untuk dilakukan sekuensing keseluruhan genom (*whole-genome sequencing*) virus AI. Keseluruhan 8 segmen genom virus AI, yaitu *polymerase basic 1* (PB1) dan *polymerase basic 2* (PB2), *polymerase acidic* (PA), *hemagglutinin* (HA), *nucleoprotein* (NP), *neuraminidase* (NA), *matrix* (M), and non-structural (NS) protein, dilakukan amplifikasi secara berkesinambungan menggunakan strategi multiplex RT-PCR (Zhou *et al.*, 2009) dengan reagent PCR SuperScript III One Step RT-PCR Kit (Invitrogen, Thermo Scientific). Preparasi pustaka DNA dan sekuensing genom AI dilakukan sesuai prosedur kerja Nextera XT and Miseq Sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA). Penyusunan, edit dan analisis hasil sekuensing dilakukan dengan software CLC Genomic Workbench v9.0.1 (QIAGEN, Aarhus, Denmark). Atas persetujuan Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, sekuen-sekuen DNA yang telah disusun dan dianalisis selanjutnya dikirim ke Genbank dengan nomor akses (*accession number*) KY614813-KY615003. Analisa filogenetik dengan rekonstruksi *Maximum-*

likelihood (ML) *tree* dengan model substitusi DNA *general time reversible* (GTR) + G dan 1000 replikasi bootstrap dilakukan dalam software MEGA v7.0.21 (Kumar et al., 2016). Analisa homologi DNA dilakukan dengan tool pencarian dalam BLAST database influenza virus di GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and GISAID (<http://platform.gisaid.org/epi3/frontend>) selanjutnya diikuti dengan kalkulasi jarak genetik menggunakan analisa *p-distance* dalam MEGA v7.0.21.

HASIL DAN PEMBAHASAN

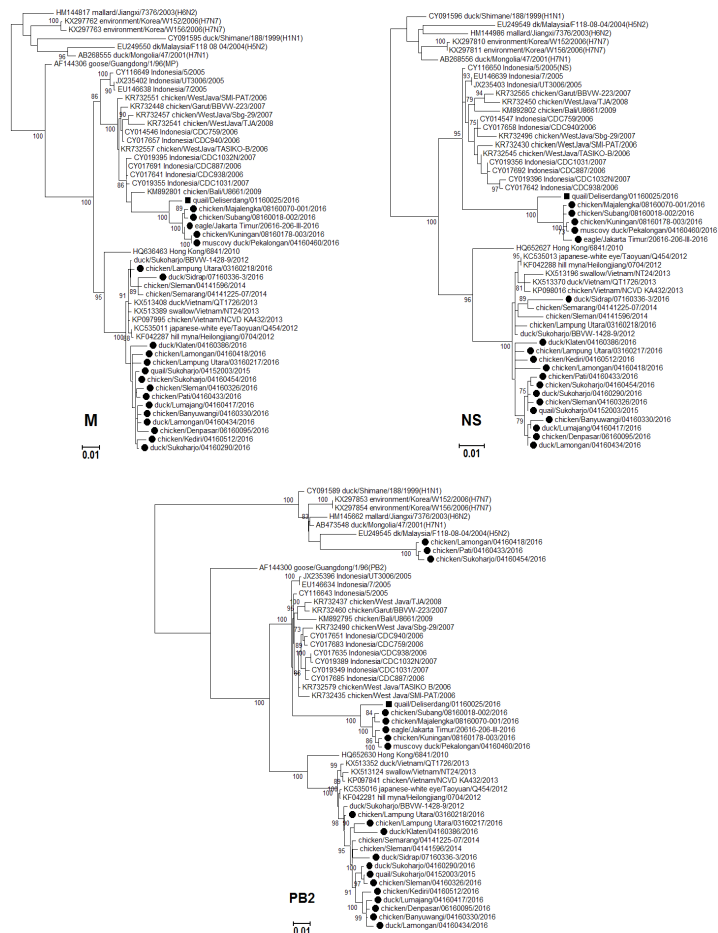
Hasil analisa filogenetik terhadap segmen gen HA menunjukkan bahwa 20 dari 21 sampel virus H5N1 termasuk dalam golongan clade 2.3.2.1c, dan hanya 1 sampel virus yang dikoleksi dari Deliserdang, Sumatera Utara (A/quail/Deliserdang/01160025/ 2016) yang terdeteksi dalam clade 2.1.3.2 (Gambar 1). Tidak ada bukti adanya perubahan signifikan pada struktur permukaan glikoprotein virus AI sebagaimana topologi pohon filogeni dari segmen gen NA memiliki kesamaan dengan topologi pohon filogeni HA (Gambar 1).



Gambar 1. Pohon maximum-likelihood gen-gen HA and NA virus-virus H5N1 yang dikoleksi dari outbreak penyakit pada unggas di Indoensia (Desember 2015-April 2016). Lingkaran hitam sebelum taxon virus menunjukkan sampel-sampel virus H5N1 clade 2.3.2.1c, sedangkan kubus hitam menunjukkan sampel virus H5N1 yang tergolong dalam clade 2.1.3.2. Nilai bootsrap $\geq 70\%$ dari 1,000 replikasi ditunjukkan pada node yang relevan dan skala bar menunjukkan substitusi asam nukleat per site.

Analisa filogenetik lebih lanjut pada segmen gen-gen internal virus AI (PB2, PB1, PA, NP, M dan NS) memperlihatkan bahwa 12 dari 20 virus H5N1 clade 2.3.2.1c memiliki arah evolusi yang sama dengan segmen

gen-gen HA dan NA (Gambar 2). Menariknya perbedaan topologi pohon filogeni dijumpai pada 5 virus Clade 2.3.2.1c yaitu: A/eagle/Jakarta Timur/2016-III/2016, A/chicken/Majalengka/ 08160070-001/2016, A/chicken/Kuningan/08160178-003/2016, A/chicken/Subang/08160018-002/2016, dan A/muscovy duck/Pekalongan/04160460/2016, serta 3 virus clade 2.3.2.1c lainnya, yaitu: A/chicken/Pati/04160433/2016, A/chicken/Sukoharjo/04160454/2016, dan A/chicken/Lamongan/ 04160418/2016, dimana hal ini merupakan indikasi adanya perbedaan asal atau sumber segmen gen internal, terutama PB2, MP and NS genes (Gambar 2).



Gambar 2. Pohon filogeni *maximum-likelihood* dari segmen gen M, NS and PB2 virus H5N1. Topologi filogenetik gen M, NS dan PB2 5 dari 20 virus H5N1 clade 2.3.2.1c viruses berada dalam kluster clade 2.1.3.2. Khusus gen PB2 dari 3 virus H5N1 clade 2.3.2.1c terindikasi kemungkinan berasal dari kelompok virus LPAI dan skala bar menunjukkan asam nukleat per site.

Table 1. Homologi asam nukleat dari virus-virus H5N1 clade 2.3.2.1c yang dipelajari terhadap beberapa rujukan virus AI.

H5N1 clade 2.3.2.1c virus name ² and Genotype ³	Segment	Homology ¹ , %							
		H5N1 clade 2.1.3.2		H5N1 clade 2.3.2.1c	H5N2	H5N6	H1N1	H7N1	H7N7
		<i>SB29/07'</i>	<i>DS025/16</i>	<i>SK1428/12</i>	<i>MY118/ 04</i>	<i>JX7376/ 03</i>	<i>SI188/99</i>	<i>MO47/01</i>	<i>KO152/06</i>
ck/Lampung Utara/03160217/2016 ck/Lampung Utara/03160218/2016 qa/Sukoharjo/04152003/2015 dk/Sukoharjo/04160290/2016 ck/Sleman/04160326/2016 ck/ Banyuwangi/04160330/2016 dk/Klaten/04160386/2016 dk/ Lumajang/04160417/2016 dk/ Lamongan/04160434/2016 ck/ Kediri/04160512/2016 dk/ Sidrap/07160336-3/2016 ck/ Denpasar/06160095/2016	PB2	91.9- 93.5	89.4-90.8	97.8-99.6	84.2- 85.2	84.4- 85.3	84.9- 85.6	84.6-85.6	84.6-85.5
	PB1	92.4- 94.8	93.2-95.4	96.3-99.1	87.6- 89.7	87.8- 89.7	88.0- 89.9	89.4-91.5	87.1-89.0
	PA	88.6- 89.4	87.3-88.2	98.2-99.4	89.0- 89.9	92.9- 93.7	91.9- 92.8	90.4-91.3	92.8-93.8
	HA	90.7- 92.2	88.2-89.3	97.8-99.7	85.5- 86.7	61.7- 62.1	64.5- 65.3	53.9-54.4	54.6-55.1
	NP	94.6- 95.6	93.4-94.2	98.3-99.1	90.4- 91.4	91.5- 92.3	89.8- 90.5	91.0-92.0	91.7-92.2
	NA	92.6- 93.8	91.1-92.2	98.2-99.6	51.2- 51.7	55.7- 56.2	89.7- 90.5	89.3-90.0	55.7-56.2
	M	94.9- 95.9	93.1-93.9	98.4-99.7	90.8- 91.8	91.9- 92.7	89.4- 90.2	90.9-91.8	91.0-91.9
	NS	93.9- 95.3	92.5-93.8	98.0-99.4	91.9- 93.3	92.6- 94.1	92.9- 94.6	92.6-94.1	92.6-94.4
ea/Jakarta Timur/20616-III/2016 ck/Majalengka/08160070-001/ 2016 ck/Kuningan/08160178-003/2016 ck/Subang/08160018-002/2016 md/Pekalongan/04160460/2016	PB2	94.5- 94.8	97.5-97.7	91.2-91.5	85.3- 85.6	85.0- 85.5	85.6- 86.0	85.5-85.8	85.4-85.7
	PB1	94.1- 94.5	94.8-95.4	98.1-98.7	88.6- 89.6	88.9- 89.4	89.3- 89.8	90.6-91.2	88.1-88.7
	PA	88.7- 89.0	87.5-87.7	98.0-98.4	89.2- 89.3	92.5- 92.9	91.6- 91.9	90.4-90.9	92.6-93.1
	HA	91.3- 91.5	88.4-88.7	98.1-98.4	86.4- 86.6	61.2- 61.5	64.6- 64.9	54.1-54.3	54.7-54.9
	NP	94.8- 95.1	93.5-94.1	98.4-99.0	90.7- 91.3	91.7- 92.2	90.1- 90.4	91.7-92.2	91.7-92.4
	NA	92.2- 93.1	90.8-91.5	98.0-98.5	51.2- 51.5	55.8- 56.0	89.5- 89.8	88.9-89.6	55.7-56.5
	M	95.4- 95.9	97.9-98.4	93.4-93.8	90.1- 90.5	91.1- 91.5	89.2- 89.4	91.1-91.3	90.8-91.2
	NS	95.3- 95.5	97.8-98.0	93.8-94.0	90.6- 90.8	91.3- 91.5	92.5- 92.8	91.8-92.0	91.8-91.9
ck/Pati/04160433/2016 ck/Sukoharjo/04160454/2016 ck/Lamongan/04160418/2016	PB2	84.8- 85.0	83.8-83.9	83.4-83.7	93.1- 93.1	93.2- 93.3	93.2- 93.3	93.5-93.7	92.7-92.7
	PB1	93.8- 94.7	94.7-95.4	97.8-98.4	88.5- 89.3	88.7- 89.2	88.9- 89.8	90.1-91.2	88.1-88.5
	PA	88.7- 88.7	87.4-87.8	98.2-98.8	89.4- 89.4	93.1- 93.2	92.1- 92.1	90.8-90.8	92.9-93.4
	HA	90.5- 91.4	88.0-88.6	97.6-98.1	85.5- 86.4	62.0- 62.1	65.1- 65.3	53.9-54.0	54.5-54.8
	NP	95.5- 95.5	94.2-94.3	99.3-99.4	91.1- 91.2	92.0- 92.1	90.3- 90.3	92.1-92.2	92.0-92.1
	NA	92.6- 93.1	91.1-91.5	98.5-99.0	51.1- 51.3	55.6- 55.8	89.7- 90.0	89.1-89.6	55.7-56.0
	M	95.7- 96.0	93.7-94.0	98.7-99.2	91.3- 91.6	92.5- 92.6	90.0- 90.1	91.50- 91.6	91.9-92.0
	NS	94.3- 95.0	93.0-93.9	98.6-99.1	92.3- 93.0	93.0- 93.8	93.8- 94.3	93.3-93.8	93.5-94.0

¹ Homologi ditunjukkan dengan range persentasi (minimum-maksimum) kesamaan asam nukleat virus-virus yang dipelajari dengan rujukan virus AI.

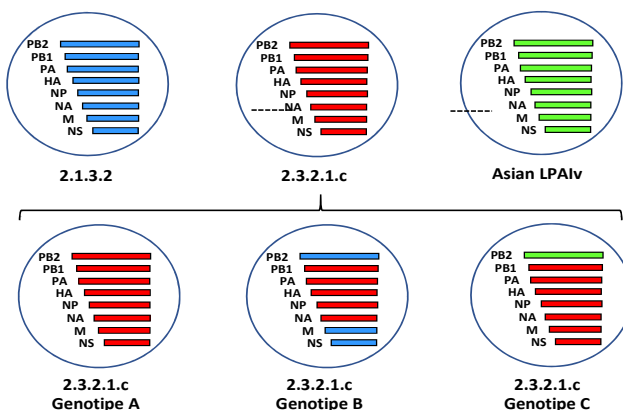
² Spesies hewan: ck, chicken; dk, duck; md, Muscovy duck; qa, quail; ea, eagle.

³ Genotipe ditentukan berdasarkan ada tidaknya reassorsi genetik dari virus-virus yang diteliti.

Analisa molekuler terhadap homologi susunan asam nukleat dan asam amino dari sampel-sampel virus H5N1 clade 2.3.2.1c yang diteliti dan

perbandingannya dengan beberapa rujukan virus AI seperti: strain tantang H5N1 Indonesia (A/chicken/West Java/Sbg-29/2007), strain vaksin H5N1 clade 2.3.2.1c (A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012), strain H5N1 clade 2.1.3.2 terkini (A/quail/Deliserdang/ 01160025/2016); dan beberapa strain virus LPAI (A/duck/Malaysia/F118-08-04/2004[H5N2], A/mallard/Jiangxi/7376/2003[H5N6], A/duck/Shimane/188/1999[H1N1], A/duck/Mongolia/47/2001 [H7N1] dan A/environment/Korea/W152/2006[H7N7]) ditunjukkan pada Tabel 1. Kesamaan genetik asam nukleat yang tinggi terdeteksi pada gen HA (range 97.6-99.7%) dan gen NA (98.0-99.6%) dari virus-virus H5N1 clade 2.3.2.1c yang diteliti terhadap strain vaksin A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012 (Clade 2.3.2.1c). Sebaliknya, homologi yang rendah ditunjukkan dari gen-gen tersebut terhadap A/chicken/West Java/Sbg-29/2007 (H5N1 clade 2.1.3.2). Hasil ini menunjukkan bahwa saat ini clade 2.3.2.1c adalah virus H5N1 yang paling sering ditemukan dari kasus-kasus outbreak penyakit HPAI pada peternakan-peternakan unggas di Indonesia.

Berdasarkan hasil analisa filogenetik dan homologi asam nukleat genom virus AI, representasi proses terjadinya reassorsi genetik dari virus H5N1 clade 2.3.2.1c di Indonesia dapat digambarkan dalam skema atau ilustrasi seperti pada Gambar 3.



Gambar 3. Skema reassorsi genetik virus H5N1 Clade 2.3.2.1c di Indonesia menunjukkan perbedaan konstelasi susunan genom virus AI (genotipe) menjadi tiga kelompok, yaitu Genotipe A, B dan C.

Data-data yang ditunjukkan di atas menggambarkan bahwa evolusi genotipe H5N1 clade 2.3.2.1c di Indonesia setidaknya terbagi menjadi tiga kelompok genotipe (penggolongan berdasarkan konstelasi susunan genom virus), yaitu: Genotipe A adalah virus-virus yang masih murni keseluruhan genomnya (8 segmen virus AI) berasal dari clade 2.3.2.1c; Genotipe B adalah virus-virus clade 2.3.2.1c yang telah bereassorsi dengan clade 2.1.3.2, dimana hal ini bisa dilihat dari kesamaan genetik segmen gen

internal dari virus clade 2.3.2.1c dari genotipe ini lebih mendekati segmen gen internal virus clade 2.1.3.2 (A/quail/Deliserdang/01160025/2016), yaitu PB2 (97.5-97.7%), M (97.9-98.4%), and NS (97.8-98.0%); dan Genotipe C, adalah virus-virus clade 2.3.2.1c memiliki segmen gen PB2 yang lebih mirip dengan segmen gen PB2 dari virus-virus LPAI (92.7-93.7%) (Tabel 1). Hasil ini menunjukkan bahwa segmen PB2 dari virus-virus ini (Genotipe C) mungkin berasal dari virus-virus LPAI yang ada dan telah bersirkulasi sebelumnya pada unggas tanpa menimbulkan gejala klinis. Investigasi dan penelitian lebih lanjut diperlukan untuk melihat prevalensi dan distribusi virus-virus LPAI pada unggas domestik maupun burung-burung liar di Indonesia. Meskipun pada periode awal outbreak penyakit HPAI H5N1 clade 2.3.2.1c (Dharmayanti *et al.*, 2014) belum ditemukan adanya reassorsi genetik, penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pertukaran gen internal dari keturunan virus yang berbeda dari H5N1 clade 2.1 dapat terjadi setelah virus telah menginfeksi, menyebar, dan memperluas keragamannya pada populasi unggas (Lam *et al.*, 2008).

KESIMPULAN

Artikel ini mengungkap hasil penelitian yang menunjukkan bahwa *whole genome sequencing* dengan teknik NGS mampu mendeteksi dan mengidentifikasi virus-virus reassortant H5N1 clade 2.3.2.1c. Pertukaran genetik terjadi pada segmen-segmen gen internal virus AI dan ini bisa terjadi antar clade virus H5N1 (*inter-lineage reassortment*) atau virus-virus yang memiliki sub tipe yang berbeda, yaitu HPAI dan LPAI (*inter-subtype reassortment*).

Masih belum jelas kapan dan dimana peristiwa reassorsi genetik tersebut terjadi. Namun, jika melihat bahwa semua sampel-sampel virus dalam penelitian ini dikoleksi dari peternakan unggas komersial kecil-menengah (sektor 3) dan peternakan pekarangan (sektor 4) yang memiliki biosekuriti rendah dan sering ditemukan pemeliharaan campuran antara ayam dan unggas air, maka ada kemungkinan pertukaran genetik terjadi pada peternakan-peternakan dengan sistem campuran (*mix-farming system*) dan biosekuriti yang rendah ini. Temuan ini juga menggarisbawahi tentang pentingnya kontinuitas surveilans molekuler untuk memantau evolusi virus influenza. Penelitian lebih mendalam juga diperlukan untuk menentukan apakah virus dengan reassortment gen yang teridentifikasi, terutama di PB2, M dan NS, menimbulkan risiko kesehatan pada spesies selain unggas.

DAFTAR PUSTAKA

- Vijaykrishna D, Bahl J, Riley S, Duan L, Zhang JX, Chen H, et al. Evolutionary dynamics and emergence of panzootic H5N1 influenza viruses. *PLoS Pathog.* 2008; **4**(9): e1000161. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000161>
- WHO/OIE/FAO. Revised and updated nomenclature for highly pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses. *Influenza Other Respir Viruses.* 2014; **8**(3): 384-388. <http://dx.doi.org/10.1111/irv.12230>.
- Wibawa H, Prijono WB, Dharmayanti NLPI, Irianingsih SH, Miswati Y, Rochmah A, et al. Disease outbreak investigation in ducks in Central Java, Yogyakarta, and East Java: Identification of a new clade of avian influenza subtype H5N1 virus in Indonesia [in Indonesian]. *Buletin Laboratorium Veteriner.* 2012; **12**(4): 2-9.
- FAO-Indonesia. FAO-ECTAD 2014 Annual Report. 2014 [cited 2017 Jan 12]. <http://www.fao.org/3/a-be827b.pdf>.
- Hartaningsih N, Wibawa H, Pudjiatmoko, Rasa FS, Irianingsih SH, Dharmawan R, et al. Surveillance at the molecular level: Developing an integrated network for detecting variation in avian influenza viruses in Indonesia. *Prev Vet Med.* 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.02.015>
- Zhou B, Donnelly ME, Scholes DT, St George K, Hatta M, Kawaoka Y, et al. Single-reaction genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical and Swine origin human influenza A viruses. *J Virol.* 2009; **83**(19): 10309-13. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01109-09>
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016; **33**(7): 1870-4. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Imai M, Watanabe T, Hatta M, Das SC, Ozawa M, Shinya K, et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature.* 2012; **486**(7403): 420-8. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10831>
- Herfst S, Schrauwen EJ, Linster M, Chutinimitkul S, de Wit E, Munster VJ, et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science.* 2012; **336**(6088): 1534-41. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1213362>

- Russell CA, Fonville JM, Brown AE, Burke DF, Smith DL, James SL, et al. The potential for respiratory droplet-transmissible A/H5N1 influenza virus to evolve in a mammalian host. *Science*. 2012; **336**(6088): 1541-7. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1222526>
- Koel BF, van der Vliet S, Burke DF, Bestebroer TM, Bharoto EE, Yasa IW, et al. Antigenic variation of clade 2.1 H5N1 virus is determined by a few amino acid substitutions immediately adjacent to the receptor binding site. *MBio*. 2014; **5**(3): e01070-14. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01070>
- Obenauer JC, Denson J, Mehta PK, Su X, Mukatira S, Finkelstein DB, et al. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*. 2006; **311**(5767): 1576-80. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1121586>
- Govorkova EA, Baranovich T, Seiler P, Armstrong J, Burnham A, Guan Y, et al. Antiviral resistance among highly pathogenic influenza A (H5N1) viruses isolated worldwide in 2002-2012 shows need for continued monitoring. *Antiviral Res*. 2013; **98**(2): 297-304.
- Dharmayanti NL, Hartawan R, Wibawa H, Balish A, Donis R, Davis CT, et al. Genetic Characterization of Clade 2.3.2.1 Avian Influenza A(H5N1) Viruses, Indonesia, 2012. *Emerg Infect Dis*. 2014; **20**(4): 677-80. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2004.130517>
- Lam TT, Hon CC, Pybus OG, Kosakovsky Pond SL, Wong RT, Yip CW, et al. Evolutionary and transmission dynamics of reassortant H5N1 influenza virus in Indonesia. *PLoS Pathog*. 2008; **4**(8): e1000130. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05577.x>