

PATOGENISITAS MOLEKULER VIRUS AVIAN INFLUENZA SUBTIPE H5N1 BEBERAPA ISOLAT AYAM TAHUN 2010-2011 DI PROPINSI SUMATERA BARAT, RIAU DAN KEPULAUAN RIAU

Yuli Miswati, Vera Oktavia, Kiki Safitria, Yade EP

ABSTRAK

Sekuens asam amino gen HA virus Avian influenza pada cleavage site yang ditentukan secara patogenisitas molekuler pada unggas di Indonesia sampai dengan tahun 2007 menunjukkan Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) dengan pola PRERRRKKR/GLF dan PQRESRRKKR/GLF. Sebanyak 7 isolat virus Avian influenza sub tipe H5N1 yang berasal dari ayam di Propinsi Sumatera Barat, Riau dan Kepulauan Riau tahun 2010 dan 2011 dianalisa patotipenya berdasarkan sekuens asam amino cleavage site (daerah pemotongan) gen HA menggunakan metode sekuensing. Produk PCR (724bp) dari setiap isolat disekuensing di Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional II Bukittinggi dengan metode dideoksi menggunakan sekuenser otomatis CEQ 8000 (Coulter Backman). Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua isolat H5N1 memiliki sekuens asam amino gen HA pada cleavage site dengan pola PQREGRRKKR/GLF dan PQRESRRKKR/GLF.

I. PENDAHULUAN

Avian influenza (AI) disebabkan oleh virus influenza A yang dapat mengakibatkan penyakit pada banyak jenis unggas seperti ayam, unggas air, burung. Selain itu infeksi yang ditimbulkan juga dapat terjadi pada manusia dan babi (Swayne, 2003). Virus Influenza adalah virus RNA berpolaritas negatif, berdiameter sekitar 80-120 nm termasuk famili Orthomyxoviridae. Virus ini memiliki *envelope* dan memiliki genom ss RNA bersegmen sehingga dapat terjadi *genetic reassortment* (Raharjo dan Nidom, 2004). Virus tersebut diklasifikasikan menjadi tipe A, B dan C berdasarkan pada perbedaan antigenik dalam protein Nukleoprotein (NP) dan Matrix (M1). Influenza A selanjutnya diklasifikasikan ke dalam beberapa sub tipe berdasarkan pada kemampuan antigenisitas dua protein permukaan yaitu hemaglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Sampai saat ini telah diidentifikasi sebanyak 16 sub tipe HA (H1-H16) dan 9 sub tipe NA (N1-N9) (Fauchier *et al*, 2005).

Avian influenza dapat ditemukan dalam dua bentuk yaitu bentuk akut atau ganas (*highly pathogenic avian influenza*, HPAI) dan bentuk ringan (*low pathogenic avian influenza*, LPAI). Istilah HPAI selanjutnya menjadi AI (Avian influenza) didefinisikan sebagai infeksi pada unggas disebabkan oleh virus Influenza A yang mempunyai indeks patogenisitas intravena lebih besar 1,2 pada ayam umur 6 minggu. Atau setiap infeksi yang disebabkan oleh virus Influenza A sub tipe H5 dan H7 dimana rangkaian nukleutidanya menunjukkan adanya pembelahan asam amino basa (*polybasic*) pada sisi pembelahan dari hemaglutininnya (OIE, 2002).

Kemampuan virus AI untuk melakukan mutasi dan reasorsi genetik memungkinkan virus untuk berubah sifat antigeniknya, patogenisitasnya serta spesifitas hospesnya (Asmara, 2005). Variasi antigenik pada virus AI dapat ditemukan dengan frekuensi tinggi dan terjadi melalui dua cara yaitu *shift* dan *drift*. Antigenik *shift* dapat timbul akibat *gene reassortment* (pertukaran atau

pencampuran gen) yang terjadi pada dua atau lebih virus influenza tipe A sehingga terjadi penyusunan kembali suatu galur virus baru yang bermanifestasi sebagai subtipe virus AI baru. Antigenik *shift* terjadi oleh adanya perubahan struktur antigenik yang bersifat dominan pada antigen permukaan H dan atau N. Antigenik *drift* dapat terjadi oleh adanya perubahan struktur antigenik yang bersifat minor pada antigen permukaan H dan atau N dan berlangsung lambat, tetapi progresif dan cenderung menimbulkan penyakit yang terbatas pada suatu kawasan. Mutasi pada materi genetik dapat menimbulkan perubahan polipeptida virus, yaitu sekitar 2-3 kali substitusi asam amino pertahun (Swayne dan Suarez, 2003).

Dalam diagnosis AI peran protein hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) yang terdapat pada amplop virus menjadi tumpuan dasar pada uji HI. Kedua protein ini merupakan target awal dalam pembentukan antibodi hospes. Pada awal infeksi, protein ini akan berikatan dengan reseptor sel hospes dan melepaskan ribonukleoprotein (RNP). Akibat aktivasi prekursor HA (HA₀) oleh protease hospes, protein akan terbelah menjadi HA₁ dan HA₂. Protein HA₁ akan berikatan dengan reseptor dan merupakan target utama untuk timbulnya respons imun, sedangkan protein HA₂ akan memfasilitasi fusi antara amplop virus dengan membran endosomal hospes (Suzuki dan Nei, 2002). Sekuen asam amino pada HA sebagai tempat pemotongan HA (HA₀) menjadi HA₁ dan HA₂ oleh protease sel hospes disebut daerah pemotongan (*cleavage site*).

Daerah pemotongan HA tergantung pada keberadaan asam amino basa Arginin (R) dan Lisin (K) pada perbatasan antara subunit HA₁ dan HA₂. Virus AI dengan daerah pemotongan satu asam amino basa (*monobasic*) (contoh : HA₁-PSIQVR/GL-HA₂) bersifat

nonvirulen, hanya dapat dipotong oleh enzim triptase yang dihasilkan epitel saluran pernafasan dan pencernaan (Chen *et al.* 2004). Sementara virus AI dengan daerah pemotongan lebih dari satu asam amino basa (*polybasic*) bersifat virulen, dapat dipotong oleh furin yang terdapat di semua sel yang menyebabkan infeksi sistemik yang fatal (Munch *et al.* 2001). Enzim proteolitik furin mengenal sekuen asam amino motif B-X-B-R (B = asam amino basa, X = asam amino non basa). Daerah pemotongan *polybasic* pada virus AI H5N1 bertanggung jawab terhadap infeksi sistemik sehingga virus dapat diisolasi dari darah, cairan cerebrospinal dan feses (WHO, 2005).

Kejadian AI H5N1 di Indonesia bersifat endemik di 31 propinsi dari 33 propinsi yang ada. Transmisi zoonotik dari unggas ke manusia terus menerus terjadi sejak pertengahan tahun 2005 sampai sekarang. Sampai saat ini (21 April 2010), kematian manusia akibat virus Avian Influenza (AI) H5N1 tercatat paling tinggi di dunia dengan jumlah kematian 135 orang dari 163 orang terinfeksi (82,82%). Semakin banyaknya transmisi zoonotik ke manusia, semakin meningkatkan potensi terjadinya pandemi (Smith *et al.* 2006). Kasus kematian manusia akibat HPAI H5N1 di Indonesia terjadi secara sporadis dan masih menimbulkan pertanyaan tentang sumber penularannya.

Wabah AI pada unggas di Indonesia pertama dilaporkan pada bulan Agustus 2003, dan wabah pertama di Regional II terjadi di kota Pariaman pada bulan Maret 2004 pada ayam buras. Gejala klinis yang ditimbulkan saat itu masih konsisten seperti kematian mendadak, petekchie pada subkutan dan perdarahan pada bagian tubuh yang tidak berbulu. Wabah AI kemudian menyebar ke kabupaten lainnya bahkan ke propinsi tetangga Sumatera Barat yakni propinsi Riau, dan tahun 2005 menyebar

kepropinsi Jambi dan Kepulauan Riau. Kasus AI yang terjadi di daerah ini tidak terjadi sepanjang waktu, setelah tidak dilaporkan pada bulan-bulan kemarau, kemudian pada musim hujan banyak terjadi kematian ternak unggas yang disebabkan oleh virus AI ini (BPPV II Bukittinggi, 2005).

Studi ini dilakukan untuk mengetahui patogenisitas virus Avian influenza subtipe H5N1 secara molekuler pada beberapa isolat dari ayam di propinsi Sumatera Barat, Riau dan Kepulauan Riau.

II. MATERI DAN METODE

2.1. Materi

Materi yang digunakan dalam studi ini adalah tujuh buah isolat (cairan alantois) AI dari ayam koleksi Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional II Bukittinggi yang berasal dari propinsi Sumatera Barat (Kota Padang, Kab. Dharmasraya), Propinsi Riau (Kota Pekanbaru, Kota Dumai, Kab. Bengkalis, Kab. Kampar) dan Propinsi Kepulauan Riau (Kota Batam) (Tabel 1). Isolat virus ini sudah diidentifikasi sebelumnya dengan metode PCR. Pemilihan isolat untuk dilakukan sekuensing dengan pertimbangan adanya kasus *suspect, high cases* di lokasi.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Bahan Ekstraksi RNA : KIT yaitu Pure Link™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, Cat : 12280-050)
- Bahan RT-PCR : primer forward (20 µM), primer reverse (20 µM) (Tabel 3), Superscript™ III One-step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen Cat. No. 10928-042) : 2x reaction mix, Superscript™ III One-step RT-PCR with Platinum® Taq mix, sampel, RFW.

Primer yang digunakan adalah empat pasang primer HA10, HA20, HA30 dan HA40(AAHL, 2010). (Tabel 1).

- Bahan Elektroforesis : agarose, Tris Buffer EDTA (TBE) 1x, Ethidium bromide, loading dye, marker.
Bahan untuk sekunsing DNA : Primer yang digunakan adalah empat pasang primer HA10, HA20, HA30 dan HA40(AAHL, 2010). (Tabel 1).
- Purifikasi dengan QIA-quickGel Extration (Qiagen Kit, Cat : 28704), reaksi sekuensing dengan Genomelab™ DTCS- Quick Satar Kit (Coulter Backman Cat. 608120). Clean up hasil PCR sekuensing dengan Agencourt® CleansSeq (Coulter Backman Cat. A 29151).

Alat yang digunakan pada penelitian adalah : mortar, micropipet, tip, plate, analytic balance, gunting, pinset, tabung reaksi, rak tabung, microtube, spin column, Biosafety Cabinet class II, sentrifus, vortex, spin, mixer, thermal cycler, bak elektroforesis dan power suply, microwave, gel documentation, Automatic Sequencer.

Tabel 1. Virus Avian influenza subtipe H5N1 isolat unggas air dan ayam yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Isolat	Asal
1.	A/Chicken/Bengkalis/BP PVII/30/2010(H5N1)	Kab. Bengkalis, Riau
2.	A/Chicken/Pekanbaru/BP PVII/298/2010(H5N1)	Kota Pekanbaru, Riau
3.	A/Chicken/Kampar/BPPVII/312/2010(H5N1)	Kab. Kampar, Riau
4.	A/Chicken/Dharmasraya/BPPVII/308/2010(H5N1)	Kab. Dharmasraya, Sumbar
5.	A/Chicker/Batam/BPPVII/318/2010(H5N1)	Kota Batam, Kepulauan Riau
6.	A/Chicken/Dumai/BPPVII/55/2011(H5N1)	Kota Dumai, Riau
7.	A/Chicken/Padang/BPPVII/73/20011H5N1)	Kota Padang, Sumbar

2.2. Metode

Ekstraksi RNA

Ekstraksi total RNA dilakukan dengan menggunakan KIT yaitu *Pure Link TM Viral RNA/DNA Mini Kit* (Invitrogen, Cat : 12280-050), sesuai dengan petunjuk produsen.

Identifikasi dan Subtipping Virus dengan Metode RT-PCR

Subtipping virus H5 telah dilakukan sebelumnya dengan metode *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) berturut-turut menggunakan pasangan primer *Forward* H5 (5'-ACA CAT GCY CAR GAC ATA CT-3') (AAHL, Geelong, Australia dan Lee *et. al.*, 2001) dan primer *Reverse* H5 (5'-CTY TGR TTY AGT GTT GAT GT-3') (AAHL, Geelong, Australia dan Lee *et. al.*, 2001) dengan ukuran produk PCR 545 bp.

Sekuensing DNA Isolat Virus AI Subtipe H5N1

RT-PCR dilakukan dengan menggunakan *SuperscriptTM III One-step RT-PCR with Platinum[®] Taq* (Invitrogen Cat. No. 10928-042). Reaksi PCR dibuat sebanyak 25 µl dengan komposisi 12,5 µl 2x reaction mix, 0,25 µl primer forward (10 µM), 0,25 µl primer reverse (10 µM), 1 µl *SuperscriptTM III One-step RT-PCR with Platinum[®] Taq mix*, 2 µl sampel RNA dan 9 µl RFW. Program RT-PCR yang digunakan adalah *reverse transcription*; 48°C 30 menit; predenaturasi ; 94°C 2 menit, kemudian diikuti 35 siklus terdiri dari denaturasi ; 94°C 30 detik, *annealing* ; 50°C 40 detik, ekstensi ; 68°C, 40 detik dan terakhir diikuti dengan post ekstensi 68°C, 5 menit (AAHL, Geelong Australia, 2010). Primer yang digunakan adalah empat pasang primer HA10, HA20, HA30 dan HA40 (AAHL, Geelong Australia, 2010). Adanya pita DNA spesifik hasil PCR diidentifikasi dengan elektroforesis pada

1,5% gel agarose dan hasilnya dibaca dibawah lampu Ultra Violet, kemudian dilakukan pemotongan gel pita DNA selanjutnya dilakukan ekstraksi/purifikasi gel.

Hasil dari purifikasi gel dilakukan pengukuran konsentrasi DNA dengan menggunakan Qubit fluorometer. Setelah itu dilakukan PCR sekuensing dengan *GenoLab DTCSQuick Start Kit* (Coulter Backman Cat No. 608120) sesuai dengan petunjuk produsen. Produk PCR sekuensing di *clean up* dengan metode Agencourt[®] CleansSeq (Coulter Backman Cat.No.A 29151). Setelah itu sampel siap di loading ke instrumen.

Instrumen yang digunakan adalah *sequencer* otomatis *Backman CEQ 8000* di Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional II Bukittinggi. Urutan nukleotida hasil sekuensing dianalisa dengan program DNA Star dan setiap isolat turunan asam aminonya disepadankan dengan program *BioEdit* dan *Clustal/W from Mega 4.2* (Kumar, *et al.*, 2007).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak tujuh isolat virus Avian influenza subtipe H5N1 yang berasal dari ayam dianalisa patotipenya berdasarkan sekuen asam amino daerah pemotongan menggunakan metode sekuensing. Produk PCR dari setiap isolat disekuensing di Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional II Bukittinggi dengan metode dideoksi menggunakan sekuenser otomatis CEQ 8000 (Coulter Backman).

Sekuon nukleotida hasil sekuensing setiap isolat dianalisa dengan program DNA Star dan turunan asam aminonya disepadankan dengan beberapa virus Avian influenza H5N1 dari GenBank (NCBI) dengan program *BioEdit* dan *ClustalW* dari MEGA 4.2 (Kumar *et al.*, 2007). Hasilnya adalah

tujuh isolat virus Avian influenza subtipe H5N1 menunjukkan bahwa semua isolat termasuk *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dengan karakteristik sekuen asam amino *polybasic* PQREGRRKKR //GLF dan PQRESRRKKR//GLF pada daerah pemotongan HA (Gambar 1).

Virus influenza A mempunyai asam amino R (Arginin) pada ujung karboksil

subunit HA1 (*cleavage site*) dan G (Glisin) pada ujung NH2 dari subunit HA2, yang bersifat stabil. Daerah pemotongan HA terletak diantara Q (Glutamin) dan G (Glisin) dengan pola asam amino Qxx...xxxR//G (// = batas antara HA1 dan HA2, x = asam amino basa dan non basa dengan jumlah dan pola tertentu) (Senne *et al*, 1996).

Gambar 1. Urutan asam amino hasil sekuensing pada gen HA di daerah pemotongan (posisi asam amino 321-330). Tujuh isolat urutan teratas adalah sampel penelitian, urutan selanjutnya adalah data dari Gene Bank.

Analisa sekuen asam amino daerah pemotongan HA semua virus Avian influenza H5N1 penyebab kematian manusia dan unggas di Indonesia berdasarkan data dari Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) menunjukkan bahwa semua virus Avian influenza subtipe H5N1 yang bersirkulasi di Indonesia menunjukkan karakter molekuler HPAI dengan sekuen asam amino pada daerah pemotongan

bervariasi. Pola sekuen asam amino daerah pemotongan PQRERRRKKR adalah khas penyebab wabah kematian unggas di Hongkong tahun 1997 dan negara-negara Asia (2003-2007) (Guan *et al*, 2004 dan Stevens *et al*, 2006). Isolat virus Avian influenza subtipe H5N1 penyebab kematian wabah kematian unggas di Indonesia tahun 2003-2004 mempunyai pola asam amino daerah pemotongan PQRERRRKKR.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Miswati (2010), patotipe virus AI H5N1 berdasarkan urutan asam amino pada daerah pemotongan (*cleavage site*) pada ayam dan unggas air di Propinsi Sumatera Barat dan Kota Pekanbaru memiliki pola PQREGRRKKR yang termasuk strain patogenik tinggi (*highly pathogenic avian influenza* HPAI). Penelitian karakterisasi molekuler virus H5N1 oleh Dharmayanti *et al* (2005) terhadap beberapa isolat Indonesia memiliki pola QQRERRRKKR. Sekuen daerah pemotongan QQRERRRKKR khas pada strain patogenik virus AI H5N1 penyebab kematian unggas di Vietnam (Stevens *et al.* 2006). Berdasarkan laporan CDC (2007), titik pemotongan PQRESRRKKR adalah khas pada virus AI:H5N1 penyebab kematian manusia di Indonesia pada tahun 2005-2007.

Sejak Juli 2005-2007 muncul kasus kematian manusia di Indonesia akibat virus Avian influenza subtipe H5N1 dengan sekuen daerah pemotongan PQRESRRKKR. Namun pada tahun 2006 juga ditemukan juga sekuen daerah pemotongan QQRERRRKKR pada isolat manusia. Adanya substitusi asam amino pada daerah pemotongan HA virus Avian influenza subtipe H5N1 dari QQRERRRKKR menjadi PQRESRRKKR kemungkinan berhubungan dengan adaptasi virus pada hospes mamalia terutama manusia.

Sekuen asam amino pada daerah pemotongan HA dari data GeneBank terhadap virus Avian influenza subtipe H5N1 yang berasal dari propinsi Sumatera Barat (Kota Padang dan Kabupaten Agam) dan propinsi Riau sampai dengan tahun 2006 (Kota Pekanbaru dan Kabupaten Siak) adalah sama yaitu PQRESRRKKR . Pola ini sama dengan sekuen asam amino pada daerah pemotongan HA isolat manusia yang menyebabkan kematian.

Pada penelitian ini terdapat enam isolat virus AI yang berasal dari ayam mempunyai sekuen asam amino pada daerah pemotongan HA dengan pola PQREGRRKKR dan satu isolat dari Kota Padang dengan pola PQRESRRKKR. Pola ini sama dengan penelitian sebelumnya tahun 2010 yang dilakukan oleh Miswati di propinsi Sumatera Barat dan Riau. Hal ini memperlihatkan bahwa virus AI H5N1 di propinsi Sumatera Barat, Riau dan Kepulauan Riau tahun 2010 - 2011 masih memiliki susunan asam amino pada daerah pemotongan HA yang sama dengan virus AI H5N1 tahun 2009, kecuali isolat dari Kota Padang pada asam amino urutan 325, diisi oleh asam amino menjadi Serin (S).

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

1. Patotipe semua virus Avian influenza subtipe H5N1 (6 isolat) yang diisolasi dari ayam di Propinsi Sumatera Barat (Kabupaten Dharmasraya), Propinsi Riau (Kota Pekanbaru, Kab. Bengkalis, Kab. Kampar, Kota Dumai) dan Propinsi Kepulauan Riau (Kota Batam) adalah HPAI (*Highly Pathogenic Avian Influenza*) dengan pola sekuen asam amino daerah pemotongan (*cleavage site*) QREGRRKKR/GLF dan satu isolat dari Kota Padang memiliki pola sekuen asam amino daerah pemotongan (*cleavage site*) QREGRRKKR/GLF
2. Karakterisasi virus AI H5N1 perlu dilakukan terus menerus baik secara molekuler maupun secara genetik, mengingat virus ini memiliki poin mutasi yang cukup tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Australian Animal Health Laboratory (AAHL). 2010. Molecular Characterisation of Avian Influenza Virus. Molecular Diagnostic Test at Australian Animal Health Laboratory (AAHL). Geelong, Australia.
- Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner Regional II Bukittinggi. 2005. Laporan Monitoring dan Surveilans Avian Influenza di Regional II.
- Chen H, Deng G, Li Z, Tian G, Li y, Jiao P, Zhang L, Liu Z, Webster RG, Yu K, 2004. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10452-10457
- Control Disease Center (CDC). 2007. Avian influenza infection in humans. <http://www.cdc.gov/> (30 Mei 2007)
- Dharmayanti NLPI, Damayanti R, Wiyono A, Indriani R, RMA, Adjid . 2005. Karakterisasi molekuler virus avian influenza isolat Indonesia. *JITV* 10 (2):127-133
- Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., 2005: Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol.* 79, 2814-2822
- Guan Y, Peiris, M., Kong, K.F. (2002): H5N1 influenza viruses isolated from geese in Southeastern China: evidence for genetic reassortment and interspecies transmission to ducks. *Virology.* 292, 16-23.
- Horimoto T, Kawaoka Y. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev* 14: 129-149
- Hulse-Post DJ, Sturm-Ramirez KM, Humbert J, Seiler P, Govorkova EA, Krauss S, Scholtissek C, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Long HT, Naipospos TSP, Chen H, Ellis TM, Guan Y, Peiris JSM, Webster RG. 2005. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10682-10687
- Miswati Y. 2010. Karakterisasi molekuler virus avian influenza sub tipe H5N1 pada ayam dan itik di Propinsi Sumatera Barat dan Kota Pekanbaru. Program Pascasarjana Universitas Andalas Padang.
- Munch M, Nielsen LP, Handberg KJ, Jorgensen PH. 2001. Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch Virol* 146:87-97
- Raharjo Y dan Nidom CA. 2004. Avian influenza, pencegahan, plengendalian dan pemberantasannya, hasil investigasi kasus lapangan. PT Gallus Indonesia Utama Jakarta.
- Senne D.A., Panigrahy B., Kawaoka Y., Pearson J.E., Suss J., Lipkind M., Kida H. & Webster R.G. (1996). Survey Of The Haemagglutinin (Ha) Cleavage Site Sequence Of H5 And H7 Avian Influenza Viruses: Amino Acid Sequence At The Cleavage Site As A Marker Of Pathogenicity Potential. *Avian Dis* 40 : 425-437.
- Smith GDJ, Naipospos TSP, Nguyen TD, Jong MD ie, Vijaikrishna D, Usman TB, Hassan SS, Nguyen TV, Dao TV, Bui NA, Leung YILC, Cheung CL, Rayner JM, Zhang LJ, Poon LLM, Li KS, Nguyen VC, Hien TT, Farrar J, Webster RG, Chen H, Peiris JSM, Guan Y. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology* 350:258-268.
- Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC, Wilson A. 2006. Structure and receptor specificity of the

- hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 312: 404-410
- Suzuki Y, Nei M. 2002. Origin and evolution of influenza virus hemagglutinin genes. *Mol Biol Evol* 19:501-509
- Swayne De, Suarez DL. 2003. Biology of avian influenza especially the change of low pathogenicity virus to high pathogenicity. Proc Latin American Poultry congress. 7 Oktober 2003. [http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.html/\[23](http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.html/[23) Maret 2006]
- World Health Organization (WHO), 2005. Recommended laboratory tests to identify Avian influenza A virus in specimens from humans. <http://www.who.int/> (Juni 2005)