

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI VIRUS AVIAN INFLUENZA PADA BERBAGAI SPESIES UNGGAS SECARA SEROLOGIS DAN MOLEKULER

Isolation and Identification of Avian Influenza in Different Species of Poultry by Means of Serological and Molecular Methods

Teuku Zahrial Helmi¹, Charles Rangga Tabbu², Wayan Tunas Artama³, Aris Haryanto³, dan Muhammad Isa¹

¹Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: zahrialbiochemistryfkhsk@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi virus *avian influenza* (AI) melalui pemeriksaan serologis dan molekuler pada unggas yang diduga terinfeksi virus AI di Provinsi Aceh. Dalam penelitian ini digunakan 37 sampel berupa *swab* trakea, kloaka, dan organ dari berbagai unggas yang berasal dari beberapa kabupaten/kota di Provinsi Aceh. Sampel dikumpulkan dan dimasukkan ke dalam media transpor dan disimpan pada kondisi 4° C sebelum dikirim ke laboratorium. Sampel diinokulasi pada telur ayam bertunas yang bebas patogen spesifik, umur 9-11 hari, untuk selanjutnya dilakukan pemeriksaan serologis dan pemeriksaan secara molekuler. Dari 37 sampel yang diinfeksi pada telur ayam bertunas, kemudian dilanjutkan dengan uji *hemagglutinin agglutination/hemagglutinin inhibition* diperoleh tujuh sampel yang positif virus AI. Dari tujuh sampel positif kemudian dilanjutkan dengan amplifikasi gen matriks dan gen *hemagglutinin*. Setelah dilakukan elektroforesis pada gel agarosa 2%, diperoleh hasil berupa pita *deoxyribonucleic acid* (DNA) pada satu posisi yang sama untuk semua isolat uji yaitu pada posisi 276 bp untuk gen matriks dan 1.725 untuk gen *hemagglutinin*. Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa virus yang menyebabkan kematian berbagai jenis unggas di Provinsi Aceh selama ini adalah akibat dari infeksi virus *avian influenza* A subtype H5.

Kata kunci: H5N1, hemagglutinin, matriks, serologis, virus AI

ABSTRACT

The purpose of this research was to identify avian influenza (AI) virus using serological and molecular methods on poultry which suspected as AI infected in Aceh province. This study used 37 samples of tracheal and cloacal swabs and organs from various species of poultry that were collected from several districts/cities in Aceh. Samples were collected and put into transport media and stored at 4° C before sending to the laboratory. Samples were inoculated in specific pathogen-free of embryonated chicken egg with the age of 9-11 days for further serological and molecular examination. From 37 samples which infected to embryonated chicken egg then followed by hemagglutinin agglutination test/hemagglutinin inhibition revealed that 7 samples were positively infected with AI virus. The amplification result of specific matrix gene primer was followed by electrophoresis on 2% agarose gel which were obtained in the form of a deoxyribonucleic acid (DNA) band at 276 bp for matrix gene and 1.725 bp for H5 gene for all isolates test. In conclusion, the virus which caused the death of various types of poultry in Aceh province is avian influenza A virus subtype H5.

Key words: avian influenza virus, H5N1, serologic, matrix, hemagglutinin

PENDAHULUAN

Virus *avian influenza* (AI) terbagi atas tiga tipe, yaitu tipe A, B, dan C, berdasarkan atas perbedaan antigen pada protein inti (*nucleoprotein*) dan protein matriks. Virus influenza A dapat menginfeksi berbagai spesies unggas, mamalia, dan manusia, dan merupakan patogen utama yang berperan dalam pandemi influenza di seluruh dunia. Virus influenza A dikelompokkan berdasarkan pada dua antigen permukaan virus, yaitu protein hemagglutinin (HA) dan protein neuraminidase (NA), yang sampai saat ini telah ditemukan 18 HA (H1-H1) dan 11 NA (N1-N11) (Tong *et al.*, 2012; Tong *et al.*, 2013).

Hospes alami dari virus *influenza* A adalah burung liar dan unggas air. Pada hospes tersebut, virus ini berada dalam keadaan seimbang dan tidak menimbulkan penyakit. Berdasarkan tingkat infeksi virus AI, maka virus tersebut dapat dikelompokkan atas dua tingkatan infeksi yaitu *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) dan *low pathogenic avian influenza*

(LPAI). Tingkatan infeksi HPAI merupakan infeksi yang sangat patogen yang dapat menyebabkan angka kematian sampai 100% (Keawcharoen *et al.*, 2011).

Faktor yang sangat memengaruhi kasus infeksi virus AI yang terus terjadi di Indonesia adalah akibat dari penanganan virus AI yang belum maksimal. Hal ini dapat dilihat dari pola distribusi unggas di pasar-pasar yang tidak terkontrol, rendahnya biosekuriti pada perternakan unggas, terutama pada Sektor 3 dan 4, penyebaran virus AI yang berasal dari unggas air liar, dan juga masih lemahnya strategi vaksinasi (Tabbu, 2000).

Identifikasi dan karakterisasi virus AI dapat dilakukan dengan beberapa cara, baik secara konvensional maupun dengan metode diagnosis secara molekuler. Penggunaan mikroskop elektron, kultur jaringan, isolasi virus pada telur ayam bertunas yang *specific pathogen free* (SPF) dan pemeriksaan secara serologis sudah umum dilakukan (Alexander, 2008). Menurut Smith dan Donis (2012), metode isolasi virus pada telur ayam bertunas yang SPF merupakan standar emas (*gold standard*) untuk diagnosis virus AI. Namun

demikian, metode ini belum dapat menjawab secara keseluruhan mengenai sifat-sifat biologis virus AI sehingga hasil isolasi virus AI pada telur ayam bertunas masih harus dilanjutkan dengan uji serologis, yaitu uji *hemagglutination* (HA) dan *hemagglutination inhibition* (HI), yang dilanjutkan sampai pada tahap uji molekuler.

Pemeriksaan virus AI dengan metode HA/HI merupakan metode diagnostik yang rutin dilakukan di laboratorium diagnostik untuk mendeteksi dan menentukan tipe dan subtype virus influenza. Namun demikian, penggunaan teknik molekuler secara langsung untuk mendeteksi virus dalam cairan alantois yang telah diinfeksi membuat identifikasi dan karakterisasi genetik virus influenza A, termasuk AI menjadi lebih cepat, tepat dan akurat.

MATERI DAN METODE

Koleksi Sampel

Sampel penelitian berupa *swab* trakea, kloaka, dan organ, yang dikoleksi dari berbagai jenis unggas, yaitu dari daerah yang dilaporkan pernah mewabah virus AI pada unggas. Sampel dikoleksi dari tujuh kabupaten di Provinsi Aceh, yaitu Kabupaten Aceh Timur, Aceh Tamiang, Aceh Utara, Bireuen, Aceh Tengah, Bener Meriah, dan Aceh Besar.

Isolasi Virus

Hasil *swab* dibawa ke laboratorium, kemudian dibuat suspensi dengan menambahkan larutan *phosphate buffered saline* (PBS), pH 7,0-7,4, dan antibiotik. Suspensi diinkubasikan pada temperatur ruangan selama 1-2 jam, yang selanjutnya diinokulasikan pada telur ayam berembrio SPF atau *specific antibody negative* (SAN) umur 9-11 hari dan telur diinkubasikan pada suhu 37° C. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam sampai hari ke-4. Pada hari ke-4 semua telur dikeluarkan dari inkubator dan disimpan pada suhu 4° C, kemudian virus dipanen dengan cara mengambil cairan korioalantoisnya (WHO, 2005; OIE, 2014).

Uji Serologis

Uji serologis dilakukan melalui uji (HA) dan (HI). Uji HA dilakukan secara mikroteknik menggunakan mikroplat bentuk V. Antigen yang berasal dari cairan alantois telur ayam bertunas (TAB) diencerkan dengan PBS pada kelipatan ganda, yakni 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, dan seterusnya sampai 1/1024. Berikutnya ditambahkan suspensi eritrosit ayam 0,5% pada setiap sumuran dan diinkubasi selama 40 menit. Setelah diketahui titer antigen, selanjutnya dibuat antigen 4 HA unit untuk digunakan pada uji HI (OIE, 2014).

Uji HI juga dilakukan secara mikroteknik menggunakan mikroplat bentuk V. Antibodi anti-H5N1 diencerkan dengan PBS pada kelipatan 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, dan seterusnya sampai 1/1024. Berikutnya pada setiap sumuran ditambah dengan antigen AI 4 HA unit dan diinkubasi selama 15 menit. Setelah berlalu ditambahkan suspensi eritrosit ayam 0,5% pada setiap sumuran dan diinkubasi selama 30 menit. Adanya hambatan aglutinasi menunjukkan adanya virus AI subtype H5 (OIE, 2014).

Desain Primer

Untuk amplifikasi gen matrix (M) menggunakan primer yang direkomendasikan oleh Payungporn *et al.* (2004), dan primer H5 didesain menggunakan informasi genetik virus H5N1 asal Huangdong tahun 2008 (*accession*: HQ677023.1) yang diperoleh dari *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). Primer didesain menggunakan *software primer3* version 4.0.0 online (<http://primer3.ut.ee/>).

Ekstraksi RNA Virus

Ekstraksi *ribonucleic acid* (RNA) virus yang berasal dari cairan korioalantois dilakukan menggunakan Purelink™ micro-to-Midi Total RNA Purification System dari Invitrogen, mengikuti prosedur standar yang direkomendasikan perusahaan. Ekstrak RNA selanjutnya digunakan sebagai *template* untuk *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) dan disimpan pada suhu -20° C sampai digunakan.

Amplifikasi Gen M dan H5 dengan Metode RT-PCR

Setelah diperoleh *template* dari proses isolasi RNA virus, maka semua isolat uji diamplifikasi terhadap gen matriks (M) dan gen heamagglutinin (HA) dengan metode RT-PCR. Sebelum dilakukan amplifikasi, dipersiapkan *master mix* dengan volume 22,5 µl untuk satu sampel. Sebanyak 1x *buffer mix reaction* dengan volume 12,5 µl dimasukkan ke dalam *tube*, kemudian ditambahkan dengan 0,5 µl *primer forward* dan 0,5 µl *primer* dengan konsentrasi 10 pmol/µl, lalu ditambahkan dengan 8 µl dH₂O dan 1 µl enzim *Taq Superscript™ III Polimerase*. Campuran *master mix* ditambahkan dengan 2,5 µl RNA *template* sehingga volume total reaksi untuk satu sampel adalah 25 µl.

Campuran reaksi PCR yang terdiri atas *master mix* dan *template* siap untuk diamplifikasi. Proses sintesis cDNA dilakukan dengan proses *reverse transcription* pada suhu 48° C selama 45 menit sebanyak satu siklus dan *initial denaturation* pada suhu 94° C selama 5 menit, sebanyak satu siklus. Kemudian proses dilanjutkan pada PCR amplifikasi sebanyak 40 siklus dengan suhu masing-masing denaturasi 94° C selama 30 detik, *annealing* 47° C selama 60 detik, ekstensi 68° C selama 30 detik, dan final ekstensi pada suhu 68° C selama 10 menit. Hasil RT-PCR kemudian di simpan pada suhu -20° C atau dapat langsung dielektroforesis.

Analisis Produk Hasil PCR dengan Elektroforesis

Produk amplifikasi PCR dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa 1% dan ditambahkan *Sybr safe* 1,5 µl (10 mg/ml). Kemudian semua sumuran gel agarose diisi dengan sampel, *marker*, dan kontrol positif, dan dilakukan *running* elektroforesis pada tegangan 135 volt selama 45 menit. Hasil elektroforesis dibaca pada *trans-illuminator viewer*.

Analisis Data

Data ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar, selanjutnya data dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel *swab* dan organ pada berbagai jenis unggas yang diduga terinfeksi virus AI pada tujuh kabupaten/kota di Provinsi Aceh disajikan pada Tabel 1. Isolasi virus dilakukan pada TAB SPF umur 9-11 hari dan diinkubasi selama 4 hari pada suhu 37° C. Selanjutnya diambil cairan korioalantois secara aseptis dan diuji aglutinasi cepat pada plat kaca menggunakan sel darah merah (SDM)/eritrosit ayam 10%. Dari 37 sampel yang diisolasi dan diuji aglutinasi cepat ditemukan sebanyak tujuh sampel yang positif mengaglutinasi sel darah merah. Berdasarkan hasil uji aglutinasi cepat ini dapat diketahui keberadaan virus dalam cairan korioalantois. Menurut Stevens *et al.* (2006) protein HA yang terdapat pada virus influenza akan melekat pada reseptor eritrosit pada berbagai jenis unggas dan mamalia, sehingga aktivitas ini digunakan sebagai dasar dalam mendeteksi keberadaan virus AI dalam cairan korioalantois. Selanjutnya dilakukan uji konfirmasi untuk menentukan nilai titernya, yaitu dengan menggunakan pengenceran dua kali pada plat dan dengan penambahan sel darah merah ayam 1% dengan volume yang sama pada semua sampel yang diuji (OIE, 2014) seperti yang disajikan pada Tabel 2.

Berdasarkan uji HA/HI dengan menggunakan antigen spesifik virus AI dan ND, maka dapat dipastikan bahwa ke-7 sampel tersebut positif virus AI. Adanya aglutinasi pada uji HA dan hambatan aglutinasi pada uji HI memperlihatkan reaksi spesifik antara virus AI dengan antibodi anti-H5N1. Jumlah (titer) virus yang tinggi ditandai dengan semakin cepat dan kuat terjadi reaksi aglutinasi. Sementara itu, adanya garis presipitasi pada uji *immune diffusion* (ID) menunjukkan karakter yang kuat dari virus AI. Hubungan antigenik antar virus AI diperlihatkan dengan garis presipitasi yang berkesinambungan (OIE, 2014).

Menurut panduan dari OIE (2014), uji HI memiliki sensitivitas tinggi karena dapat mendeteksi antigen HA virus AI sub tipe H5 secara spesifik. Uji HI lebih spesifik dalam mendeteksi antigen HA yang dimiliki oleh sub tipe H5, tetapi sulit membedakan virus AI yang berhasil diisolasi berasal dari sub tipe H5N1, H5N2, atau H5N9. Jika hanya didasarkan pada uji HI, amat sulit untuk menentukan jenis sub tipe. Oleh karena itu, konfirmasi diagnostik dengan RT-PCR atau pengurutan genetik menjadi syarat mutlak untuk mengarakterisasi sub tipe H5N1 (Krafft *et al.*, 2005).

Hasil inokulasi dan uji HA/HI yang positif kemudian dilanjutkan dengan *screening* untuk menentukan tipe dari virus AI dengan cara melakukan amplifikasi terhadap gen matriks. Amplifikasi ini dilakukan dengan metode *single step* RT-PCR dan menggunakan satu pasang primer yang spesifik terhadap virus influenza A, yaitu *reverse* dan *forward*. Primer yang digunakan seperti yang direkomendasikan oleh Payungporn *et al.* (2004), dengan produk amplifikasi sebesar 276 bp, yang spesifik gen matrix (M).

Hasil amplifikasi gen matriks kemudian dilakukan elektroforesis pada *agarose gel* 2% dan diperoleh hasil berupa pita *deoxyribonucleic acid* (DNA) pada satu posisi yang sama untuk semua isolat uji, yaitu pada posisi 276 bp seperti yang disajikan pada Gambar 1.

Berdasarkan hasil elektroforesis pada Gambar 1, maka dapat diketahui bahwa proses RT-PCR yang dilakukan berlangsung dengan baik tanpa adanya kontaminasi. Hasil ini spesifik untuk menunjukkan virus AI tipe A, tetapi kurang spesifik untuk penentu sub tipe H5N1. Gen M dengan panjang 1027 bp yang mempunyai daerah yang relatif *conserved* dibanding gen HA. Gen M dapat dilacak dengan menggunakan beberapa jenis primer M (Horimoto dan Kawaoaka, 2001). Hal penelitian ini sesuai dengan laporan Helmi

Tabel 1. Sampel *swab* dan organ pada berbagai jenis unggas yang diduga terinfeksi virus AI di Provinsi Aceh

No	Asal sampel (Kab/Kota)	Jenis unggas dan jumlah sampel			Jumlah sampel
		Ayam	Itik	Puyuh	
1	Aceh Timur	3	1	-	4
2	Aceh Tamiang	2	1	-	3
3	Aceh Utara	2	1	6	9
4	Bireuen	2	2	9	13
5	Aceh Besar	3	2	-	5
6	Aceh Tengah	1	1	-	2
7	Bener Meriah	1	-	-	1
Jumlah		14	8	15	37

Tabel 2. Hasil uji *hemagglutination* (HA) dan *hemagglutination inhibition* (HI), dan *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) gen matriks (M)

No	Asal isolat virus	Hasil uji HA	HI serum anti AI	HI serum anti ND	Hasil RT-PCR gen M	Hasil RT-PCR gen H5
1.	Ayam petelur Aceh Besar	+	+	-	+	+
2.	Puyuh Aceh Utara	+	+	-	+	+
3.	Puyuh Aceh Utara	+	+	-	+	+
4.	Puyuh Aceh Utara	+	+	-	+	+
5.	Puyuh Bireuen	+	+	-	+	+
6.	Puyuh Bireuen	+	+	-	+	+
7.	Puyuh Bireuen	+	+	-	+	+

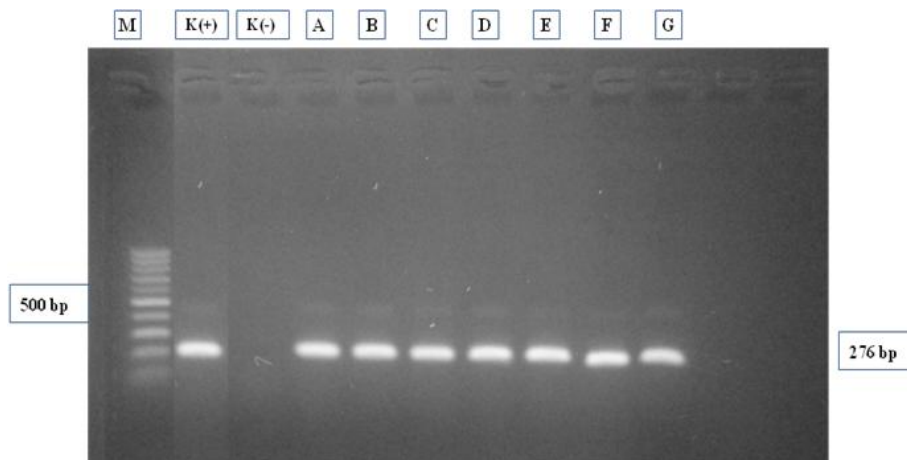
(2014), *screening* sampel virus AI yang pernah mewabah di Provinsi Aceh tahun 2006 sampai 2008 yang dilakukan dengan primer matriks 276 bp akan memunculkan pita DNA hanya pada kelompok virus AI tipe A.

Protein matriks virus AI terdiri atas dua, yaitu protein matriks M1 dan M2, dengan *open reading frame* (ORF) dimulai pada nukleotida ke-26 sampai nukleotida ke-781 yang menyandi protein M1, sedangkan pada nukleotida ke-26 sampai ke-740 sampai ke-1.007 menyandi protein M2. Protein M1 dan M2 mempunyai peran dalam penyusunan virion AI. Protein M1 tidak hanya sebagai komponen struktural virus, tetapi juga berperan pada awal infeksi dalam pemisahan protein M1 dan RNP untuk masuk ke dalam sitoplasma sel tropisme. Di lain pihak, protein M2 bersama dengan protein HA dan NA menyusun struktur amplop virus dan berperan sebagai saluran ion (Reid *et al.*, 2002).

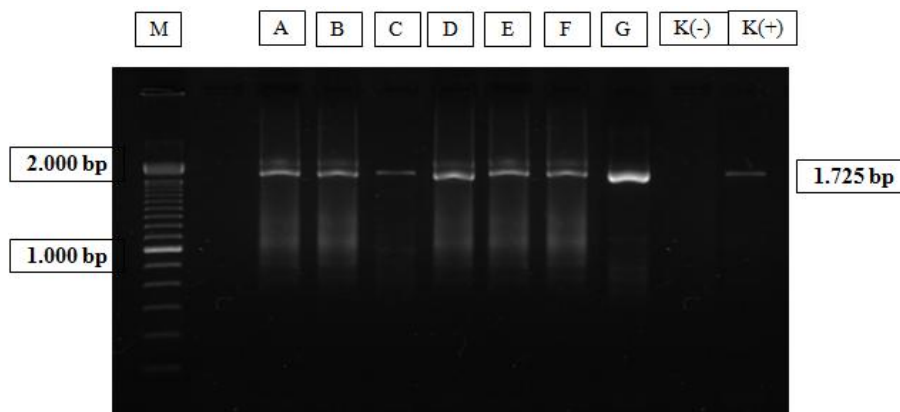
Semua sampel positif gen matriks, kemudian dilanjutkan dengan amplifikasi terhadap gen hemaglutinin. Hasil pengujian menunjukkan bahwa semua sampel termasuk kedalam subtipe H5 yang ditandai dengan munculnya pita DNA pada posisi 1.725 bp. Hasil pengujian dengan primer H5 disajikan pada Gambar 2.

Pada tulisan ini, primer spesifik yang digunakan untuk mengamplifikasi gen H5 merupakan primer yang dirancang sendiri dengan *software* primer3 version 4.0.0 online (<http://primer3.ut.ee/>). Primer didesain menggunakan urutan yang telah diketahui yang diperoleh dari *database* di NCBI. Sensitivitas dan spesifisitas reaksi RT-PCR sangat ditentukan oleh urutan oligonukleotida primer yang digunakan. Berdasarkan hasil yang disajikan pada Gambar 2, terlihat bahwa sampel hasil penelitian seperti pada sampel (C) yaitu virus berasal dari ayam petelur pita DNA yang muncul sangat tipis, sedangkan pada sampel lain yang berasal dari puyuh, pita yang muncul sangat tebal. Hal ini kemungkinan disebabkan karena primer yang digunakan kurang spesifik terhadap virus AI yang berasal dari ayam. Reaksi demikian menunjukkan kemungkinan telah terjadinya mutasi gen HA dari virus AI yang berasal dari ayam.

Mutasi pada virus AI dapat terjadi melalui *antigenic drift* (*point mutation*) akibat tekanan imunologis dan usaha virus untuk menghindari dari sistem imun tubuh inang. Pada kondisi lain, mutasi terjadi melalui *antigenic shift* akibat penataan genetik dari beberapa subtipe (*genetic reassortment*), yang mengarah pada timbulnya evolusi virus (Chen *et al.*, 2004) sehingga sangat perlu dilakukan pembuktian lanjutan terhadap gen neuraminidase (NA)



Gambar 1. Hasil elektroforesis produk RT-PCR fragmen gen matriks (M) pada 7 sampel penelitian yang diuji (Marker: 100 bp) K(+)= Kontrol positif; K(-)= Kontrol Negatif; lajur A, B, C, E, F, G= Virus asal Puyuh; D= Virus asal ayam petelur



Gambar 2. Hasil elektroforesis produk RT-PCR fragmen gen matriks (M) pada 7 sampel penelitian yang diuji. (Marker: 100 bp) K(+)= Kontrol positif; K(-)= Kontrol negatif; lajur A, B, D, E, F, G= Virus asal puyuh; C= Virus asal ayam petelur

atau melalui pengurutan pada gen HA untuk mengetahui adanya mutasi pada basa nukleotida dan asam amino. Konfirmasi yang paling tepat untuk menentukan subtype virus AI adalah melalui penggunaan primer yang tepat, baik primer H5 untuk amplifikasi gen HA maupun primer N1 untuk amplifikasi gen NA, atau dengan melakukan pengurutan untuk mengetahui urutan nukleotida pada kedua gen yang menyandi subtype tersebut (Gutiérrez *et al.*, 2009; OIE, 2014).

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa identifikasi virus AI dapat dilakukan dengan metode konvensional yaitu melalui uji HA/HI dan juga secara molekuler yaitu melalui amplifikasi gen dengan metode RT-PCR. Pada pemeriksaan dengan metode RT-PCR, pemilihan atau desain primer yang tepat sangat diperlukan. Melalui penelitian ini dapat dibuktikan bahwa virus yang menyebabkan kematian berbagai jenis unggas (ayam, itik, dan puyuh) di Indonesia, khususnya di Provinsi Aceh selama ini adalah akibat dari infeksi virus AI tipe A dan subtype H5.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Balai Besar Veteriner Wates di Yogyakarta, Kementerian Pertanian Republik Indonesia dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada yang telah menyediakan tempat untuk melaksanakan penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia yang telah mendanai proyek penelitian ini melalui dana Hibah Penelitian Disertasi Doktor Tahun Anggaran 2014 dengan No. 076/UN11.2/PL/SP3/2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, D.J. and I. Capua. 2008. Avian influenza in poultry. *World's Poultry Sci. J.* 64(4):513-532.
- Chen, H., G. Deng, Z. Li, G. Tian, Y. Li, P. Jiao, and K. Yu. 2004. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101(28):10452-10457.
- Gutiérrez, R.A., M.J. Naughtin, S.V. Horm, S. San, and P. Buchy. 2009. A (H5N1) virus evolution in South East Asia. *Viruses.* 1(3):335-361.
- Helmi, T.Z. 2014. Penentuan subtype virus *avian influenza* dengan metode *single step multiplex reverse transcriptase- polymerase chain reaction* (RT-PCR) isolat asal Provinsi Aceh. *J. Ked. Hewan.* 8(1):72-75.
- Horimoto, T. and Y. Kawaoka. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:129-149.
- Keawcharoen, J., J.V.D. Broek, A. Bouma, T. Tiensin, A.D.M.E. Osterhaus, and H. Heesterbeek. 2011. Wild birds and increased transmission of highly pathogenic avian influenza (H5N1) among poultry, Thailand. *Emerging Infectious Diseases.* 17(6):1016-1022.
- Krafft, A.E., K.L. Russell, A.W. Hawksworth, S. McCall, M. Irvine, L.T. Daum, and J.L. Taubenberger. 2005. Evaluation of PCR testing of ethanol-fixed nasal swab specimens as an augmented surveillance strategy for influenza virus and adenovirus identification. *J. Clin. Microbiol.* 4:1768-1775.
- OIE. 2014. **Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animal.** World Organisation for Animal Health.
- Payungporn, S., P. Phakdeeewitrot, S. Chutinimitkul, A. Theamboonlers, J. Keawcharoen, K. Oraveerakul, A. Amonsin, and Y. Poovorawan. 2004. Singlestep multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. *Viral Immunol.* 17:588-593.
- Reid, A.H., G.F. Thomas, A.J. Thomas, M. Sherman, and K.T. Jeffery. 2002. Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus matrix gene segment. *J. Virol.* 76(21):10717-10723.
- Smith, G.J. and R.O. Donis. 2012. Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): Updated nomenclature. *Influenza and Other Respiratory Viruses.* 6(1):1-5.
- Stevens, J., O. Blixt, T.M. Tumpey, J.K. Taubenberger, J.C. Paulson, and I.A. Wilson. 2006. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science.* 312(5772):404-410.
- Tabbu, C.R. 2000. **Penyakit Ayam dan Penanggulangannya. Penyakit Bakterial, Mikal, dan Viral.** Jilid 1. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Tong, S., X. Zhu, Y. Li, M. Shi, Z. Jing, M. Bourgeois, Y. Hua, X. Chen, R. Sergio, J. Gomes, L.M. Chen, A. Johnson, Y. Tao, C. Drefus, W. Yu, R.M. Bride, P.J. Carney, A.T. Gilbert, J. Chang, Z. Guo, C.T. Davis, J.C. Paulson, J. Steven, C.E. Rupprecht, E.C. Holmes, I.A. Wilson, and R.O. Donis. 2013. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 9(10):e1003657.
- Tong, S., Y. Li, P. Rivaviller, C. Conrardy, D.A. Castillo, L.M. Chen, S. Recuenco, J.A. Ellison, C.T. Davis, I.A. York, A.s. Turmelle, D. Moran, S. Rogers, M. Shi, Y. Tao, M.R. Weil, K. Tang, L.A. Rowe, S. Sammons, X. Xu, M. Frace, K.A. Lindblade, N.J. Cox, L.J. Anderson, C.E. Rupprecht, and R.O. Donis. 2012. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 109(11):4269-4274.
- WHO. 2005. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerging Infectious Diseases.* 11(10):1515.