

Ulasan Sistematis: Marka Molekular Penanda Patogenitas dan Sebaran Inang Pada Virus Avian Influenza H5N1

Kindi Adam¹, R.Aj. Sri Wulandari²

¹ Pusat Biomedis & Teknologi Dasar Kesehatan, Balitbangkes, Kemenkes RI.

² Fakultas Kedokteran Universitas Negeri Sebelas Maret

email: kindi_adam@litbang.depkes.go.id

Abstract

The epidemic arising out of H5N1 virus infection causes death case and material loss. Mutation of H5N1 virus that signify the increase of pathogenicity and change of dispersal of host response can be used to reference for early warning system of epidemic caused of avian influenza virus. The objective of this research is to obtain information related to molecular markers of pathogenicity of avian influenza. Reference searching is use to collect information about molecular markers related to pathogenicity. The keywords used on this study are: Avian influenza, H5N1, mutation, Pathogenicity, HA, NA, PB, PA, and NS. Thirty three research papers, 4 reviews and 1 scientific seminar are used on this research. The HA, NA and NS genes was reported to be an important gene that have molecular marker related to increase of pathogenicity. Whereas HA, PB1, PB2 and PA genes was related to the adaptive ability and the dispersal of host of avian influenza virus. There is 30 amino acid that sign as molecular markers of pathogenicity of avian influenza H5N1. Mutation on 30 molecular markers of HA, NA, PB and NS genes can be used as predictor to anticipate mutation orientation of avian influenza virus to become highly pathogenic and host alteration. Thereby, virus mutation to become highly pathogenic can be anticipated early.

Keywords : Highly pathogenic avian Influenza, Mutation, Molecular Marker, Pathogenicity. HA, NA, PB, NS

Abstrak

Epidemi akibat virus H5N1 telah menimbulkan banyak korban jiwa dan materi. Mutasi virus H5N1 yang menandakan peningkatan patogenitas dan perubahan sebaran inang dapat dijadikan acuan untuk sistem deteksi dini kewaspadaan epidemi akibat virus avian influenza. Penelitian ini bertujuan mendapatkan informasi terkait dengan marka molekular penanda patogenitas virus avian influenza H5N1. Ulasan sistematis ini dilakukan dengan penelusuran literatur menggunakan *Google scholar* dan PubMed. Kata pencarian yang digunakan adalah *Avian influenza, H5N1, mutation, Pathogenicity, HA, NA, PB, PA, NS*. Referensi yang digunakan adalah 33 jurnal, 4 ulasan penelitian dan 1 seminar ilmiah dari dalam dan luar negeri. Gen HA, NA dan NS merupakan gen penting yang memiliki penanda molekular yang berkaitan dengan peningkatan patogenitas virus *avian influenza*. Sedangkan gen PB1, PB2 dan PA berhubungan dengan adaptasi dan perubahan rentang inang. Jumlah penanda patogenitas pada gen HA, NA, PB dan NS adalah 30 asam amino. Mutasi pada 30 marka genetik gen HA, NA, PB dan NS merupakan penanda molekular yang dapat digunakan sebagai panduan awal untuk mengantisipasi arah mutasi virus avian influenza menuju pergeseran rentang inang dan peningkatan patogenitasnya. Dengan demikian, perubahan virus *avian influenza* menjadi bersifat *highly pathogenic* dapat diantisipasi lebih dini.

Kata kunci : Highly pathogenic *avian Influenza*, Mutasi, Marka Molekular, Patogenitas., HA, NA, PB, NS.

Pendahuluan

Indonesia merupakan negara dengan jumlah kematian akibat infeksi oleh *avian influenza* yang terbesar di dunia yang mewabah sejak tahun 2003. Kerugian yang diakibatkan oleh wabah ini pada manusia dan industri ternak unggas sangat besar.¹ Virus, termasuk di dalamnya avian influenza, memiliki tingkat mutasi yang sangat tinggi. Mutasi virus dapat menyebabkan peningkatan patogenitas, perubahan sifat antigenik dan spesifitasnya terhadap hospes.²

Rentang inang dan patogenitas virus avian influenza bersifat poligenik. Faktor determinan yang menentukan rentang inang dan patogenitas pada virus avian influenza terdapat pada gen HA, PB1, PB2, PA, NA dan NS.^{3,4} Sedangkan faktor yang berperan dalam perubahan spesifitas dan adaptasi pada inang adalah gen polimerase (PA, PB1 dan PB2).⁴

Perubahan sebaran inang virus AI ditemukan terjadi dalam 2 mekanisme yaitu shift (cepat) dan drift (lambat). Shift antigenik terjadi karena *gene reassortment* (pertukaran atau pencampuran gen) yang terjadi pada 2 atau lebih virus influenza tipe A sehingga terjadi pembentukan galur virus baru. *Drift* antigenik merupakan perubahan struktur antigenik minor pada antigen permukaan H dan/atau N. *Drift* antigenik ini berlangsung lambat, progresif dan cenderung terbatas penyebarannya. *Gene rearrangement* diduga berperan besar dalam mekanisme timbulnya strain virus influenza baru pada mamalia yang bersifat pandemik.^{2,5}

Kejadian luar biasa (KLB) yang terjadi di Indonesia pada rentang waktu 2006-2008 menimbulkan banyak korban jiwa pada manusia dan juga kerugian ekonomi pada industri unggas. Untuk mencegah berulangnya KLB akibat infeksi virus avian influenza, dibentuk sistem deteksi dini untuk mewaspadai adanya mutasi pada virus avian influenza yang bersifat *highly pathogenic*. Sistem deteksi dini

dibangun dengan membandingkan hasil sekuensing surveilans virus avian influenza dengan data marka molekular penanda patogenitas virus avian influenza.

Kajian ini bertujuan untuk mengetahui marka molekular dari berbagai hasil penelitian yang berhubungan dengan patogenitas dan perubahan sebaran hospes virus avian influenza H5N1 pada gen HA, NA, PB dan NS.

Metode

Kajian ini adalah ulasan sistematis terhadap literatur penelitian yang membahas patogenitas avian influenza terhadap manusia dan unggas. Kajian ini dilakukan di Jakarta pada bulan April-Mei 2011. Kata kunci yang digunakan dalam menelusuri pustaka terkait penelitian atas patogenitas avian influenza adalah: *Avian influenza*, H5N1, *mutation*, *Pathogenicity*, HA, NA, PB, PA, Matriks, NS serta kata sambung dan/atau. Penelusuran dilakukan dengan menggunakan peramban *Google Scholar*, NCBI dan PubMed. Kriteria inklusi referensi adalah merupakan hasil penelitian analisis deskriptif, eksperimental, ulasan penelitian dan konferensi atau seminar ilmiah oleh pakar yang kompeten. Kriteria eksklusi yang digunakan adalah penelitian yang bukan merupakan referensi awal terkait mutasi pada avian influenza, penelitian yang membahas aspek diluar mutasi dan perubahan molekular pada gen avian influenza.

Didapatkan 157 referensi yang berhubungan dengan mutasi, patogenitas dan sebaran inang pada virus avian influenza H5N1. Referensi yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi didapatkan 33 referensi penelitian, 4 ulasan penelitian dan 1 seminar ilmiah yang membahas patogenitas avian influenza baik dari dalam maupun luar negeri.

Hasil pencarian dikelompokkan ke dalam kelompok gen yang mengalami

mutasi yaitu HA, NA, PB, dan NS. Mutasi pada gen atau perubahan epigenetik yang menyebabkan atau meningkatkan patogenitas avian influenza disebut marka molekular penanda patogenitas avian influenza.

Hasil

Penelusuran dilakukan dengan menggunakan peramban *Google Scholar*, NCBI dan PubMed. Didapatkan 33

referensi penelitian, 4 ulasan penelitian dan 1 seminar ilmiah yang membahas patogenitas avian influenza baik dari dalam maupun luar negeri.

Gen yang berperan penting dalam peningkatan patogenitas virus avian influenza adalah HA, NA dan NS. Sedangkan gen berperan penting dalam perubahan sebaran inang adalah HA, NA, PB.

Tabel 1 : Mutasi yang Berhubungan dengan Patogenitas Virus Avian Influenza

Gen	Protein	As Amino	Asal	Mutasi	Keterangan	Referensi
HA	HA	160	Thr	Ala	Mutasi titik	Yen et al, 2009;
	HA	182	Asn	Lys	Mutasi titik	Yamada et al, 2006
	HA	190	Glu	Asp	Mutasi titik	Gutierrez et al, 2009
	HA	192	Gln	Arg	Mutasi titik	Yamada et al, 2006
	HA	193	Lys	Arg	Mutasi titik	Stevens et al, 2008
	HA	226	Gln	Leu	Mutasi titik	Stevens et al, 2006
	HA	227	Ser	Arg	Mutasi titik	Yen et al, 2009
	HA	228	Gly	Asn	Mutasi titik	Stevens et al, 2006
NA	NA	146	Asn	Arg/Tyr	Mutasi titik	Reid et al, 2000
	NA	274	His	Thr	Mutasi titik	Ward et al, 2005
PB	PB1	66	Asn	Ser	Mutasi titik	Conenello et al, 2007
	PB2	627	Glu	Leu/Arg	Mutasi titik	Sinya et al, 2004;
	PB2	701	Asn	Asp	Mutasi titik	LI et al, 2005
NS	NS1	42	Ala/pro	Ser	Mutasi titik	Jiao et al, 2008
	NS1	80-84			Delesi	Long et al, 2008
	NS1	92	Asp	Glu	Mutasi titik	Solorzano et al, 2005;
	NS1	97	Asp	Glu	Mutasi titik	Seo et al, 2002
	NS1	103	Phe	Leu	Mutasi titik	Dankar et al, 2011
	NS1	106	Met	Ile	Mutasi titik	Dankar et al, 2011
	NS1	127	*	Asn	Mutasi titik	Min et al, 2007
	NS1	149	Val	Ala	Mutasi titik	Li et al, 2006
	NS1	189	*	Asn	Mutasi titik	Subbarao et al, 2000
	NS1	191-194			Delesi	Zhu et al, 2008
	NS1	195	Ser	Thr/Tyr	Mutasi titik	Bornhold et al, 2008
NS1	228	Ser	Pro	Mutasi titik	Jackson et al, 2008	

Ket : * asam amino lain

Terdapat 8 titik mutasi yang mempengaruhi patogenitas virus avian influenza pada gen HA. Sedangkan pada gen NA dan PB patogenitas berhubungan dengan masing-masing 2 dan 3 titik mutasi. Pada gen yang mengekspresikan protein NS1, patogenitas virus berhubungan dengan 17 mutasi atau delesi gen NS. Gen NS dan HA dapat disebut sebagai determinan penting yang berperan penting dalam menentukan sebaran hospes serta patogenitas virus avian influenza.

Pembahasan

Patogenitas dan sebaran hospes virus avian influenza bersifat poligenik. Gen yang diketahui berperan dalam menentukan patogenitas virus avian influenza adalah HA, NA dan NS dengan NS sebagai faktor determinan penting patogenitas virus avian influenza. Gen yang berhubungan dengan sebaran hospes serta kemampuan infeksi terhadap sel inang adalah HA, NA dan PB, dengan HA sebagai protein penting yang erat kaitannya dengan reaksi antigen dan antibodi sel inang. Kajian ini terbatas pada penelitian analisis deskriptif dan penelitian eksperimental yang dipublikasikan di jurnal yang dapat ditelusur oleh peramban *Google scholar* atau yang terdaftar pada NCBI dan PubMed. Publikasi yang dikaji terutama adalah publikasi pada jurnal tidak berbayar, namun beberapa jurnal berbayar yang melaporkan hasil penelitian yang sangat penting tetap dijadikan referensi.

Protein Hemagglutinin (HA)

Protein HA merupakan antigen permukaan yang berperan penting dalam transmisi virus. Perbedaan virus influenza yang menyerang manusia dan unggas adalah protein HA. Protein HA pada virus yang menyerang unggas berikatan dengan reseptor asam sialat α 2-3. Sedangkan virus influenza pada manusia HA berikatan

dengan reseptor asam sialat α 2-6. Sedangkan influenza yang menginfeksi babi diketahui mampu berikatan dengan kedua jenis reseptor tersebut.⁶ Berdasarkan penelitian terakhir, diketahui bahwa manusia memiliki sedikit reseptor asam sialat α 2-3 yang umumnya dimiliki oleh unggas.⁷

Kecenderungan ikatan reseptor virus H5N1 pada suatu spesies tertentu dapat berubah hanya dengan substitusi sejumlah kecil asam amino pada protein HA.⁸ Mutasi pada asam amino 226 dan 228 dari hemagglutinin virus avian H2 dan H3 penting untuk spesifitas ikatan reseptor pada manusia.⁷ Pada virus influenza H5, mutasi pada tempat sama telah banyak diteliti secara eksperimental.^{9,10} Pertukaran asam amino posisi 226 dari Glutamin (Gln) ke Leusin (Leu) dan posisi 228 dari Glisin (Gly) menjadi Serin (Ser) akan menyebabkan perubahan dari reseptor tipe avian ke manusia yang dapat menyebabkan transmisi dari manusia ke manusia.^{10,11} Meskipun demikian, residu HA 226Leu dan 228Ser tidak pernah terdeteksi pada isolat virus H5N1 di lapangan berdasar pada informasi sekuen yang ada.^{11,12} Kemungkinan hal ini terjadi karena virus dengan mutasi tersebut tidak mampu bertahan pada unggas sehingga transmisi pada hospes mamalia tidak terjadi.⁷

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mendeteksi posisi-posisi lain pada hemagglutinin virus yang berperan dalam adaptasi virus H5N1 ke hospes manusia. Perubahan pada posisi 227 dari Serin (ser) menjadi asparagin (Arg) dan penghilangan glikosilasi N-linked pada residu 158 dapat meningkatkan afinitas pengikatan pada SA α 2,6 Gal dan juga mempengaruhi tingkat kematian dan penyebaran secara sistemik.¹¹

Mutasi glutamat (Glu) menjadi aspartat (Asp) pada posisi 190 dilaporkan mengurangi afinitas ikatan α 2,3 sialosida.¹² Perubahan pada posisi ini

secara alamiah ditemukan pada isolat India.¹³ Mutasi alami pada posisi 193 dan 158 dilaporkan meningkatkan ikatan virus pada reseptor manusia jika dikombinasikan dengan substitusi reseptor dari pandemi virus H3. Perubahan Lisin (Lys) menjadi arginin (Arg) pada posisi 193 spesifik untuk klade 2.1 (termasuk Indonesia) dan klade 2.2. Secara struktural posisi ini dapat mempengaruhi spesifitas reseptor karena terletak pada α heliks yang berada pada bagian atas RBD.⁷

Perubahan pada asam amino 160 dari treonin (Thr) menjadi alanin (Ala) yang menyebabkan hilangnya glikosilasi pada posisi 158-160 mempunyai kontribusi pada ketidakmampuan virus untuk mengikat SA α 2,3 Gal dan penting untuk transmisi pada marmut. Transmisi bervariasi di antara strain yang berbeda. Perubahan asam amino tunggal pada 186Lis, 196Arg, 226Leu, 227Asp dan 228Ser seperti yang terdapat pada sebagian besar virus manusia dapat mengikat baik glikan α 2,3 dan α 2,6.^{11,14}

Beberapa isolat H5N1 yang diambil dari manusia yang terinfeksi menunjukkan bahwa gen HA telah mengalami mutasi pada posisi 182, 192, 226 atau 228 dan mutasi ini menyebabkan perubahan antigen HA yang sensitif pada dua jenis reseptor, asam sialat α 2-3 dan asam sialat α 2-6. Mutasi ini yang menyebabkan perubahan patogenitas virus dari virus unggas menjadi virus manusia yang bersifat pandemik.^{11,15}

Protein Neuraminidase (NA)

Protein neuraminidase merupakan enzim yang ada pada permukaan virus yang membantu pelepasan virus hasil reproduksi dari sel yang terinfeksi. Neuraminidase berperan dalam menghidrolisis ikatan antara galaktosa dan N-acetylneraminic pada rantai ujung oligosakarida-glikoprotein. Fungsi NA ini harus berperan seimbang dengan HA agar aktivitas enzimatik dalam pelepasan asam

sialat sel yang terinfeksi tidak menurunkan efisiensi infeksi sel berikutnya. Bila dua atau lebih strain virus avian influenza menginfeksi sel secara bersama-sama, maka sangat mungkin terjadi pengacakan segmen genom virus termasuk gen penyandi NA dan HA yang dapat memunculkan strain baru dengan kombinasi genom baru dan memiliki spesifitas hospes yang berbeda dengan virus asalnya.⁵

Mutasi yang memicu patogenisitas yang terjadi pada gen NA virus avian influenza yang diuji pada mencit terjadi pada urutan asam amino 146 dari asparagin (Asn) menjadi arginin (Arg) atau tirosin (Tyr). Mutasi ini menyebabkan hilangnya site glikosilasi. Mutasi ini diketahui muncul pada virus avian influenza mematikan yang mewabah di Spanyol tahun 1918.¹⁶

Mutasi pada gen NA diketahui juga berhubungan dengan resistensi terhadap pengobatan oseltamivir. Mutasi pada asam amino 274 dari histidin (His) menjadi treonin (Thr) menurunkan efisiensi pengobatan oseltamivir pada pasien avian influenza.¹⁷ Resistensi oseltamivir disebabkan menurunnya sensitifitas penangkapan oseltamivir yang difasilitasi oleh protein NA melalui *oseltamivir binding pocket*.¹⁸

Protein Polimerase Basa (PB)

Protein polimerase basa virus H5N1 terbagi menjadi 2 sub unit yaitu PB1 dan PB2. Protein PB1 merupakan polimerase virus yang penting dalam virulensi virus ini. Gen ini mengkode protein PB1 dan PB1-F2. Protein PB1 merupakan komponen yang berperan penting dalam polimerase virus. Sedangkan gen PB2 akan mengkode protein PB2. Ketiga jenis protein tersebut sangat penting bagi replikasi virus karena sel host tidak memiliki *RNA-dependen RNA polymerase*.

Protein PB1 merupakan endonuklease yang berperan dalam pembelahan ujung 5'

dari RNA inang. PB1-F2 merupakan *reading frame* alternatif dari gen RNA PB1 yang berinteraksi dengan 2 komponen kompleks pori mitokondria, ANT3 dan VDCA1. PB1-F2 diduga berkontribusi pada patogenitas virus dan berperan penting dalam pandemi dari infeksi virus ini.

Sedangkan PB2 bertanggungjawab dalam pengikatan kembali ujung 5'. Diketahui bahwa protein PB2 juga berperan penting dalam replikasi namun mekanisme lebih detilnya masih belum diketahui. Pada penelitian Solomon et al.¹⁹ perubahan yang terjadi pada NA dan HA diketahui tidak menentukan patogenitas. Penentu patogenitas pada mencit dan musang ditentukan oleh gen-gen polimerase

Mutasi yang terjadi pada gen PB1-F2 pada posisi 66 dari asparagin (Asn) menjadi serin (Ser) berhubungan dengan patogenitas virus yang diisolasi dari H5N1 isolat hongkong. Perubahan yang sama juga ditemukan pada protein PB1-F2 yang diisolasi dari pandemi yang terjadi pada tahun 1918.²⁰

Pada virus avian influenza yang menginfeksi manusia diketahui memiliki mutasi pada posisi 627 menjadi lisin (Lys) atau arginin (Arg). Pada virus avian influenza yang bersifat *Low Pathogenic* pada mamalia, posisi asam amino 627 adalah glutamin (Gln). Bukti lain yang menunjukkan peningkatan patogenitas virus avian influenza yang memiliki mutasi pada posisi 627 adalah terjadinya penurunan sifat patogenitas pada mamalia saat dilakukan mutasi terarah pada posisi asam amino 627 dari lisin atau arginin menjadi glutamin. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa peningkatan patogenitas ini berhubungan dengan peningkatan kemampuan replikasi virus pada inang yang sesuai.^{21,22,23, 24}

Virus dengan 627Lys memiliki kemampuan replikasi tinggi pada mamalia, namun tidak pada unggas. Pada unggas,

virus dengan 627Glu memiliki kemampuan replikasi lebih tinggi.²¹

Posisi mutasi lain yang diketahui berhubungan dengan patogenitas virus avian influenza adalah pada posisi 701 dari Asparagin (Asn) menjadi asam aspartat (Asp).^{25,26} Mekanisme yang mendasari perubahan ini masih diteliti lebih lanjut.

Protein Nonstruktural (NS)

Patogenitas dari influenza H5N1 berhubungan dengan protein non NS. Aktivitas protein NS1 berhubungan dengan transport seluler RNA, *splicing* dan translasi. NS1 juga berhubungan dengan peningkatan respon inflamasi sitokin, khususnya yang berhubungan dengan TNF α yang diinduksi oleh virus ini pada makrofag.²⁷

Beberapa penelitian terakhir menunjukkan bahwa protein NS1 berperan besar dalam virulensi virus dengan melemahkan sistem pertahanan tubuh inang yang berbasis pada interferon.^{28,29,30,31,32} Titik mutasi penting yang perlu diperhatikan dalam gen NS lebih banyak dibandingkan dengan gen lainnya. Oleh karenanya, gen NS dapat disebut sebagai determinan penting dalam patogenitas virus avian influenza.

Mutasi yang terjadi pada posisi 42 dari alanin (Ala) atau prolin (Pro) menjadi serin (Ser) meningkatkan virulensi dengan menjadi antagonis IFN dan menjadikan NF1 lebih mampu aktivasi NF-kB sehingga menginduksi apoptosis.²⁸ Delesi asam amino urutan 80-84 meningkatkan resistensi virus terhadap IFN dan TNF yang diinduksi oleh infeksi virus H5N1.³³ Mutasi pada posisi 92 dan 97 dari aspartat (Asp) menjadi glutamat (Glu) meningkatkan resistensi terhadap IFN dan TNF.^{32,33,34}

Titik lain mutasi yang berhubungan dengan patogenitas adalah perubahan asam amino fenilalanin (Phe) menjadi leusin (Leu) pada posisi 103 dan perubahan dari metionin menjadi isoleusin (Ile) pada

posisi asam amino 106. Kedua mutasi tersebut berhu-bungan dengan sintesis protein dan replikasi virus.³⁵

Mutasi pada posisi asam amino pada 127 menjadi asparagin (Asn) menghambat aktivasi PKR region dan regulasi temporal sintesis RNA.³⁶ Mutasi pada posisi asam amino 149 dari valin (Val) menjadi alanin (ala) meningkatkan antagonisme NS1 terhadap aktiivitas interferon.³⁷ Mutasi pada posisi 189 menjadi asparagin (Asn) dan delesi asam amino nomor 191-195 serta mutasi pada posisi 195 dari serin (Ser) menjadi treonin (Thr) atau tirosin (Tyr) akan melemahkan virus dalam melawan IFN.^{38,39,40} Mutasi pada posisi ujung C posisi 228 dari serin (Ser) menjadi prolin (Pro) mempengaruhi PDZ *binding domain*, membuat virus resisten terhadap IFN dan TNF.^{41,42} Mutasi yang terjadi pada ujung C diduga merupakan determinan utama patogenitas letal dari seluruh gen avian influenza pada manusia atau unggas.

Sebagai respon adaptasi evolusioner, mutasi yang terjadi pada gen virus avian influenza tidak terelakan lagi. Untuk mencegah kembali mewabahnya infeksi avian influenza pada manusia, terlebih lagi adaptasi virus tersebut untuk dapat melakukan infeksi antar manusia, maka diperlukan sebuah sistem pengawasan dini untuk mengetahui arah mutasi yang terjadi. Antisipasi ini perlu dilakukan secara berkala karena tingginya intensitas mutasi yang terjadi pada virus avian influenza.

Kesimpulan

Mutasi pada 30 marka genetik gen HA, NA, PB dan NS dapat digunakan sebagai panduan awal untuk mengantisipasi arah mutasi virus avian influenza menuju pergeseran rentang inang dan peningkatan patogenitasnya

Saran

Penelitian untuk mengetahui perubahan patogenitas dan virulensi virus influenza secara genotipe pada 30 posisi marka molekuler genom virus Influenza perlu dilakukan secara periodik dan berkesinambungan. Dengan demikian, indikasi adanya perubahan parogenitas dan virulensi virus influenza dapat di deteksi sejak dini.

Ucapan Terima Kasih

Penulis menyampaikan terima kasih kepada tim penelitian Avian Influenza di Universitas Gadjah Mada dan tim Virologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes untuk memberi kesempatan penulis menyusun ulasan sistematis ini.

Daftar Rujukan

1. Neumann G , Chen H, Gao GF, Shu Y, Kawaoka Y. H5N1 Influenza Viruses: Outbreaks and Biological Properties. *Cell Research*. 2010; 20: 51-61.
2. Asmara W. Diversitas genetik dan potensi penularan virus avian influenza ke manusia. *Avian Influenza: a global new life threatening disease*;2006 juni 18. FK UGM.
3. Wright, P. F. and R.G. Webster. Orthomyxoviruses. In *Fields Virology* 4thedn.(eds. Knipe, D.M. & Howley, P.M.) (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001) 1533-1579
4. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of The 1918 Influenza Virus Polimerase Genes. *Nature*. 2005; 437: 889-93.
5. Webster RG, Bean WJ., Gorman OT, Chambers TM & Kawaoka Y. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiol. Rev.*1992; 2(56): 152-79.
6. Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE, Chambers TM, Kiso M, et al. Sialic acid species as a determininant of host range of influenza A viruses. *J. Virol*. 2000; 74: 11825-31.
7. Stevens J, Blixt O, Chen LM, Donis RO, Paulson JC, Wilson IA. Recent avian H5N1 viruses exhibit increased propensity for acquiring human receptor specificity. *J.Bio Mol*. 2008; 385(5):1382-94.
8. Auewarakul P, Suptawiwat O, Kongchanagul A, Sangma C, Suzuki Y, Ungchusak K, et al. An avian influenza H5N1 virus that binds to a human-type receptor. *J. Virol*. 2007; 81: 9950-5.

9. Suzuki Y. Sialobiology of Influenza Molecular Mechanism of Host Range Variation of Influenza Viruses. *Biol. Pharm. Bull* 2005; 28(3) 399—408.
10. Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC, Iwanak A, Wilson IA. Structure and Receptor Specificity of the Hemagglutinin from an H5N1 Influenza Virus. *Science*. 2006; 312.
11. Yen HY, Aldridge JR, Boona ACM, Ilyushina NA, Salomona R, Hulse-Post DJ, et al. Changes in H5N1 influenza virus hemagglutinin receptor binding domain affect systemic spread. *PNAS*. 2009; 106 (1):286-91.
12. Gutiérrez RA, Naughtin MJ, Horm SV, San S, Buchy P. A(H5N1) Virus Evolution in South East Asia. *Viruses* 1. 2009; 335-61.
13. Chakrabarti AK, Pawar SD, Cherian SS, Koratkar SS, Jadhav SM, Pal B, et al. Characterization of the Influenza A H5N1 Viruses of the 2008-09 Outbreaks in India Reveals a Third Introduction and Possible Endemicity. *PLoS ONE* . 2009; 4(11).
14. Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE, Chambers TM, Kiso M, et al. Sialic acid species as a determinant of host range of influenza A viruses. *J. Virol*. 2000; 74: 11825-31.
15. Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, et al. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature*. 2006; **444**:378-382.
16. Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, Taubenberger JK. Characterization of the 1918 “Spanish” influenza virus neuraminidase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 6785–90.
17. Ward P, Small I, Smith J, Shuter P, Duskowski R. Oseltamivir (Tamiflu) and its potential for use in the event of an influenza pandemic. *J Antimicrobial Chemoter*. 2005; 55, suppl.S1, i5-i21.
18. Moscona A. Neuraminidase Inhibitor for Influenza. *N Eng J Med*. 2005; 353: 1363-73.
19. Solomon R, Franks J, Govorkova EA, et al. The Polymerase Complex Genes Contribute To The Higher Virulence of The Human H5N1 Influenza Virus Isolate A/Vietnam/1203/04. *J Exp Med*. 2006; 203:689-97
20. Conenello GM, Zamarin D, Perrone LA, Tumpey T, Palese P. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog*. 2007; 3:1414-21.
21. Sinya K, Hamm S, Hatta M, et al. PB2 Amino Acid at Position 627 Effect Replicative Efficiency, but Not cell Tropism, of Hongkong H5N1 Influenza A Virus in Mice. *Virology*. 2004; 320:258-66.
22. Crescenzo-Chaigne B, Naffakh N, van der Werf S. Comparative Analysis of Ability of The Polymerase Complexes in Influenza Viruses Type A, B and C to Assemble into Functional RNPs That Allow Expression and Replication of Heterotypic Model RNA Template in vivo. *Virology*. 1999; 265:342-53.
23. Massin P, van der Werf S, Naffakh N. Residue 627 of PB2 is a Determinant of Cold Sensitivity in RNA Replication of Avian Influenza Viruses. *J. Virol*. 2001; 75:5398-404.
24. Naffakh N, Massin P, Escoriot N, et al. Genetic Analysis of The Compatibility Between Polymerase Protein from Human and Avian Strain of Influenza A Viruses. *J. Gen Virol*. 2000; 5:1283-91.
25. Li Z, Chen H, Jiao P, et al. Molecular Basis of Replication of Duck H5N1 Influenza Viruses in Mammalian Mouse Model. *J. Virol*. 2005; 70: 12058-64.
26. Gabriel G, Dauber B, Wolff T, et al. The Viral Polymerase Mediates Adaptation of an Avian Influenza Virus to a Mammalian Host. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:18590-95.
27. Szretter K J, Gangappa S, Lu X, Smith C, Shieh W-J, Zaki SR, et al. Role of host cytokine responses in the pathogenesis of avian H5N1 influenza viruses in mice. *J. Virol*. 2007; 81:2736–44.
28. Jiao P, Tian G, Li Y, Deng G, Jiang Y, Liu C, Liu W, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H. Single Amino Acid Substitution in the NS1 Protein Changes the Pathogenicity of H5N1 Avian Influenza Viruses in Mice. *J. Virol*. 2008; 82(3): 1146-54.
29. Wan XF, Ren T, Luo KJ, Liao M, Zhang GH, Chen JD, et al. Genetic characterization of H5N1 avian influenza viruses isolated in southern China during the 2003–04 avian influenza outbreaks. *Arch Virol*. 2005; 150, 1257–66.
30. Quinlivan M, Zamarin D, Garcia-Sastre A, Cullinane A, Chambers T, Palese P. Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein. *J. Virol*. 2005; 79:8431–39.
31. Seo SH, Hoffman E, Webster RG. Lethal H5N1 Influenza Viruses Escape Host Anti-viral Cytokine Responses. *Nat. Med*. 2002; 8: 950-54.
32. Solorzano A, Webby RJ, Lager KM, Jenke BH, Sastre AG, Richt JA. Mutation on The NS1 Protein of Swine Influenza virus Impair Anti-interferon Activity and Confer Attenuation in Pigs. *J. Virol*. 2005; 12: 7535-43.
33. Long, J.-X., D.-X. Peng, Y.-L. Liu, Y.-T. Wu, and X.-F. Liu. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide

- deletion in the viral nonstructural gene. *Virus Genes*. 2008; 36:471–78.
34. Seo SH, Hoffman E, Webster RG. Lethal H5N1 Influenza Viruses Escape Host Anti-
 35. Dankar SK, Wang S, Ping J, Forbes NE, Keleta L, Li Y, et al. Influenza A Virus NS1 gene mutations F103L and M106I increase replication and virulence. *Virology*, 2011; 8:13.
 36. Min J-Y, Li S, Sen GC, Krug RM. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology*. 2007; 363:236–43.
 37. Li Z, Jiang Y, Jiao P, Wang A, Zhao F, Tian G, et al. The NS1 gene contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses. *J. Virol*. 2006; 80:11115–23.
 38. Subbarao K, Shaw MW. Molecular aspects of avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans. *Rev. Med. Virol*. 2000; 10:337–48.
 - viral Cytokines Responses. *Nat. Med*. 2002; 8: 950-54.
 39. Zhu Q, Yang H, Chen W, Cao W, Zhong G, Jiao, et al. A Naturally occurring deletion in Its NS gene contributes to the attenuation of H5N1 swine influenza virus in chickens. *J. Virol*. 2008;82(1): 220-8.
 40. Bornholdt ZA, Prasad BVV. X-ray Structure of NS1 From A Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus. *Nature*. 2008; 456: 985-9.
 41. Jackson D, Hossain MJ, Hickman D, Perez DR, Lamb RA. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008 105:4381–6.
 42. Obenauer JC, Denson J, Mehta PK, Su X, Mukatira S, Finkelstein DB, et al. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*. 2006; 311:1576–80.

