

## Pelacakan Kasus Flu Burung pada Ayam dengan *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction\**

(DETECTION OF AVIAN INFLUENZA IN CHICKENS  
BY REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION)

Gusti Ayu Yuniati Kencana<sup>1</sup>, I Gusti Ngurah Kade Mahardika<sup>1,2</sup>,  
Ida Bagus Kade Suardana<sup>1</sup>, I Nyoman Mantik Astawa<sup>1</sup>,  
Ni Made Krisna Dewi<sup>2</sup> Gusti Ngurah Narendra Putra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Udayana, Denpasar  
Email: yuniatikencana@gmail.com

<sup>2</sup>UPT Laboratorium Biomedika,  
Fakultas Kedokteran Hewan, Unud

### ABSTRAK

Penyakit flu burung/*avian Influenza* (AI) merupakan penyakit zoonosis yang berbahaya dan mematikan yang disebabkan oleh virus avian influenza ganas (HPAI) subtipe H5N1. Di Indonesia penyakit AI bersifat endemik. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kasus AI pada ayam di Bali. Isolasi virus dilakukan pada telur ayam bertunas umur sembilan hari, dan diidentifikasi dengan metode hemaglutinasi (HA) dan hambatan hemaglutinasi (*hemagglutination inhibition/ HI*). Seluruh sampel selanjutnya diuji dengan *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR). Penelitian dilakukan di UPT Laboratorium Biomedika FKH Unud, Denpasar selama periode tahun 2009-2011. Dari enam belas sampel yang diperiksa, sepuluh sampel positif, terdiri atas enam kasus lapangan dan empat sampel potongan daging ayam. Sampel kasus lapangan adalah ayam yang diduga terinfeksi virus AI berdasarkan gejala klinis dan perubahan patologi anatomi yang menciri. Hasil isolasi dan identifikasi sampel kasus AI asal ayam mengindikasikan penyakit tersebut masih ada dan belum dapat ditangani secara tuntas di Bali.

Kata-kata kunci: flu burung, avian influenza, AI-H5N1, ayam, HA/HI, RT-PCR.

### ABSTRACT

Avian Influenza (AI) or Bird Flu is a fatal zoonotic disease caused by highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus of H5N1 sub-type. The disease is still endemic in Indonesia. This study was conducted to investigate AI cases in chickens in Bali. Virus isolation was performed in 9 day-old embryonated chicken eggs, and then followed by serologic testing by haemagglutination (HA) and Haemagglutination Inhibition (HI) assay using standard microtiter procedure. All of the samples were further tested with reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). All work has been done in the Biomedical and Molecular Biology Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Udayana University, Denpasar, during the period 2009-2011. A total of ten samples were examined A total of ten chicken samples consisting of 6 field samples and 4 meat samples have been confirmed to be AIV H5N1. All field cases showed clinical signs and gross pathology that were typical to the infection of avian influenza. The result indicates that AI cases are still prevalent among chickens in Bali.

Key words: avian influenza, AI-H5N1, chicken, HA/HI, RT-PCR, Bali.

\* Makalah sudah pernah dipresentasikan secara oral dalam Seminar Nasional : "Pertemuan Teknis antar Balai dan Workshop Virologi Tingkat Nasional" di Yogyakarta pada tanggal 17-20 Oktober 2011.

## PENDAHULUAN

Penyakit flu burung/*avian influenza* (AI) disebut pula "*bird flu*" dan secara luas dikenal masyarakat di Indonesia. Penyebabnya adalah virus *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) subtipe H5N1 (Wright dan Webster, 2001). Virus HPAI subtipe H5N1 telah mewabah pada unggas hampir di seluruh belahan dunia (OIE, 2004; WHO, 2005; Smith *et al.*, 2006). Di Indonesia kasus AI pertama kali dilaporkan pada beberapa peternakan ayam ras komersial di Jawa Barat dan Jawa Tengah, kemudian secara cepat menyebar ke berbagai daerah di Jawa, Lampung, Sumatra dan Kalimantan, (Kandun, 2006, Smith *et al.*, 2006), sedangkan di Bali kasus AI pertamakali dilaporkan pada ayam buras (Mahardika *et al.*, 2004). Tahun 2003 sampai 2006, flu burung telah ditetapkan sebagai kejadian luar biasa (KLB) di Indonesia. Penyakit flu burung sangat berbahaya karena bersifat zoonosis dan mematikan, baik pada unggas maupun pada manusia. Gejala klinis yang ditimbulkan sangat bervariasi, mulai dari infeksi yang bersifat ringan/asimtomatik sampai infeksi yang berakibat fatal dan bersifat multisistemik (Swayne dan Suarez, 2000).

Pada awal kasus AI yakni sebelum tahun 1997 para ahli berpendapat bahwa ada *host-specific barrier* yang mencegah virus AI untuk menginfeksi manusia. Pendapat tersebut karena sebenarnya inang alami dan reservoir virus AI adalah unggas air liar. Namun, fakta di Indonesia serta laporan dari berbagai negara di dunia menunjukkan bahwa virus AI subtipe H5N1 telah dapat menginfeksi dan menimbulkan penyakit pada berbagai jenis unggas dan penularan yang terbatas pada manusia (WHO., 2005; Smith *et al.*, 2006). Peristiwa tersebut menunjukkan bahwa virus AI subtipe H5N1 telah mampu untuk menembus barrier antar spesies hewan unggas, mamalia, dan manusia (de Jong dan Hien, 2006).

Sampai saat ini penyakit flu burung bersifat endemik di Indonesia. Usaha isolasi dan identifikasi virus AI masih perlu dilakukan untuk mengetahui perkembangan penyakitnya. Kasus AI dapat dideteksi dengan melakukan isolasi dilanjutkan dengan identifikasi virusnya. Inokulasi dilakukan pada telur ayam bertunas (TAB) umur sembilan hari, dan uji serologi dengan HA/HI. Selain kurang sensitif Uji HA/HI hanya bisa menentukan subtipe H

saja. Karena itu, telah dikembangkan uji RT-PCR yang bisa digunakan baik untuk subtipe H mau pun N. Teknik RT-PCR untuk melacak virus AI pada hewan terinfeksi bukan hal yang baru. Teknik tersebut pertama dikembangkan oleh Zhang dan Evans (1991). Keunggulan utama teknik tersebut adalah hasilnya cepat dapat diketahui, efektif dan dapat dipakai untuk menentukan subtipe virus AI. Selain itu, produk RT-PCR dapat diseku, selanjutnya dipakai untuk analisis filogenetik yang berguna untuk mengetahui asal-usul virus (Lee *at al.*, 2001). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kasus AI pada ayam di Bali menggunakan teknik HA/HI dan RT-PCR.

## METODE PENELITIAN

### Sampel Virus

Sampel penelitian berupa kasus lapangan yang diperiksa di Laboratorium Biomedika FKH Unud, Denpasar periode tahun 2009-2011 dengan diagnosis penyakit AI. Sebanyak 16 sampel telah diperiksa, 10 sampel di antaranya merupakan kasus lapang asal ayam sedangkan enam sampel lainnya berupa potongan daging ayam dengan diagnosis sementara suspect AI. Sampel organ yang dipakai adalah proventrikulus, ventrikulus, usus, sekatan sil, paru-paru dan otak. Semua sampel digabung, digerus dibuat suspensi 10% dalam larutan *Phosphat Buffered Saline* (PBS) steril yang mengandung 1000 IU/ug penisilin/streptomisin..

Inokulasi suspensi virus dilakukan melalui ruang alantois telur ayam berembrio (TAB) umur sembilan hari dengan dosis 0.1 ml per telur. Telur diinkubasikan pada inkubator bersuhu 37°C selama tiga hari dan diamati setiap hari. Panen cairan alantois dilakukan 3x24 jam pascainokulasi dan selanjutnya digunakan sebagai sumber antigen. Konfirmasi virus menggunakan serum AI standar dari Balai Besar Penelitian Veterinr (BBalitvet) Bogor, dengan uji hemaglutinasi (HA) dan uji hambatan hemaglutinasi (HI) teknik mikrotiter prosedur baku (OIE, 2009). Pekerjaan laboratorium dilakukan dalam ruangan khusus yang dilengkapi dengan *Biosafety Cabinet Class III (BSC-III)* bertekanan negatif dan *autoclave*. Semua bahan dan alat yang telah digunakan disterilisasi terlebih dahulu dalam *autoclave* sebelum dikeluarkan dari ruangan.

### Uji Hemaglutinasi/ Teknik Mikrotiter

Prosedur uji hemaglutinasi teknik mikrotiter plat U. Suspensi virus diencerkan berseri kelipatan dua dalam larutan PBS pada setiap sumuran plat mikro 96 sumuran. Ke dalam setiap sumuran kemudian ditambahkan suspensi sel darah merah 1%. Setelah digoyang-goyang selama 30 detik, terjadinya hemaglutinasi diamati pada setiap sumuran. Titer HA virus AI dinyatakan sebagai antilog pengenceran tertinggi virus yang masih mampu menghemaglutinasi sel darah merah 1% secara sempurna (OIE, 2009).

### Uji Hambatan Hemaglutinasi

Uji hambatan hemaglutinasi dilakukan berdasarkan prosedur baku dari OIE tahun 2009 dengan dua kali ulangan. Serum antivirus AI diencerkan berkelipatan dua dengan larutan PBS pada sumuran plat mikro 96 sumuran. Ke dalam setiap sumuran kemudian ditambahkan suspensi virus AI 4 HA unit dan dibiarkan pada suhu kamar selama 1 jam. Setelah digoyang-goyang selama 30 detik, adanya hambatan hemaglutinasi diamati pada setiap sumuran. Titer HI dinyatakan sebagai antilog pengenceran tertinggi serum yang masih mampu menghambat virus untuk menghemaglutinasi sel darah merah secara sempurna. Adanya hambatan hemaglutinasi oleh serum antivirus AI standar terhadap isolat virus menunjukkan bahwa sampel yang diperiksa positif AI

### Uji RT-PCR

Isolasi RNA virus dilakukan menggunakan sampel hasil panen cairan alantois TAB yang diinokulasi dengan sampel lapangan. Dari sampel, RNA diisolasi dengan metode Trizol. Ke dalam 0,25 ml sampel dalam tabung ependorf ditambahkan 0,75 ml Trizol LS. Setelah diinkubasikan pada suhu kamar selama lima menit, ke dalam campuran ditambahkan kloroform sebanyak 0,2 ml. Suspensi spesimen, trizol, dan kloroform dikocok kembali sampai homogen dan inkubasikan pada suhu kamar (15-30°C) selama 15 menit. Tabung selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 *relative centrifuge force* (RCF) selama 15 menit. Bagian aquaeus diambil dan dimasukkan ke dalam tabung steril. Ke dalamnya ditambahkan isopropil alkohol sebanyak 0,5 ml dan diinkubasikan selama 10 menit pada suhu kamar. Setelah disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 RCF selama 5 menit, supernatant dibuang, dan ditambahkan alkohol 70%

sebanyak 1 ml. Setelah divorteks dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 7.500 RCF selama 5 menit, supernatant dibuang, sedangkan peletnya dikeringkan, dan disuspensi kembali dengan *diethylpicrocarbonate* (DEPC)-treated water (Invitrogen, USA).

Amplifikasi RT-PCR dilakukan dengan menggunakan *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). Siklus RT-PCR dilakukan dengan kondisi 50°C selama 1 jam, 95°C selama 7 menit, 94°C selama 45 detik, 52°C selama 45 detik, dan *elongasi* pada suhu 72°C selama 1 menit 30 detik disebut satu siklus. Siklus pertama diulang kembali sebanyak 44 kali. Penyempurnaan kerja enzim dilakukan pada suhu 72°C selama 5 menit untuk memperoleh fragmen yang sempurna.

Virus AI dideteksi dengan primer HA680F (5'-ACATCAACACTRAAYCAGAG-3') dan HA1378R (5'-ATTYTCCATKAGAACYAG RAGTC), sedangkan N1 dideteksi dengan primer NA431F (5'-AGCCYTRYTGAATGACCAARC-3') dan NA825R (CCTCRTARTGRTAATTAGGRGC-3') (Salzberg *et al.* 2007).

Pengamatan hasil RT-PCR dilanjutkan dengan mengambil 10% dari produk RT-PCR, ditambahkan *loading dye* (*Bromphenol-blue* dan *Cyline Cyanol*) sebanyak 1 µl, dan selanjutnya dielektroforesis pada gel konsentrasi 1% (1 g agarose dalam 100 ml *tris acetic edta* (TAE) kemudian ditambahkan *etidium bromide* sebanyak 2,5 µl bersama 100-bp *ladder* (Invitrogen) sebagai *marker*. *Transluminator ultraviolet* (UV) digunakan untuk visualisasi DNA, dan hasilnya didokumentasikan dengan kamera dan film Polaroid.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pengamatan Klinikopatologi dan Isolasi Virus pada TAB

Sebanyak 16 sampel yang diperiksa, sepuluh di antaranya positif AI. Enam sampel yang positif berasal dari kasus lapangan asal ayam ras, sedangkan empat sampel berupa potongan daging ayam. Diagnosis flu burung kasus lapangan, berdasarkan atas gejala klinis dan perubahan patologi anatomi yang menciri. Pemeriksaan terhadap potongan daging ayam hanya dilakukan dengan RT-PCR. Hasil isolasi virus pada telur ayam bertunas umur sembilan hari ditandai dengan kematian embrio pada hari ketiga, perdarahan dan gangguan

pertumbuhan yang dicirikan dengan embrio tampak lebih kerdil. Identifikasi virus AI menggunakan uji serologi HA/HI, hasilnya dua kasus negatif, namun dengan pemeriksaan RT-PCR sepuluh sampel dinyatakan positif AI H5N1. Data hasil pemeriksaan sampel yang positif AI H5N1 berdasarkan atas asal isolat virus, hasil identifikasi dengan uji serologi HA/HI dan RT-PCR disajikan pada Tabel 1

### Hasil Konfirmasi dengan Uji RT-PCR

Konfirmasi lebih lanjut dengan uji RT-PCR digunakan untuk mengetahui subtipe virus AI. Hasil uji RT-PCR, ternyata semua kasus yang diperiksa adalah positif AI dengan subtipe H5N1. Penelitian menunjukkan bahwa untuk melacak infeksi virus AI, RT PCR memiliki keunggulan dibandingkan dengan teknik lainnya, misalnya inokulasi pada TAB maupun kultur sel dan uji Elisa (Shankar *et al*, 2009).

Teknik RT-PCR sekarang telah digunakan untuk menggantikan teknik isolasi virus pada TAB maupun kultur sel (Taubenberger dan Layne, 2001). Keunggulan uji RT-PCR dibandingkan dengan HA/HI adalah karena hasil uji lebih cepat dan lebih sensitif. Uji RT-PCR dikatakan lebih sensitif oleh karena hanya memerlukan volume sampel antigen yang lebih sedikit dibandingkan dengan uji HA/HI. Keunggulan yang lain adalah bahwa uji RT-PCR juga dapat dipakai untuk menentukan subtipe N1 sedangkan H5 bisa ditentukan baik dengan uji HA/HI maupun dengan RT-PCR (OIE, 2009). Contoh hasil uji RT-PCR kasus AI subtipe H5N1 dari sampel ayam yang diperiksa pada penelitian ini disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil RT-PCR isolat virus AI H5N1 kasus lapangan asal ayam

Keterangan: Lajur 1 marker 100 bp DNA ladder (Invitrogen), lajur 2 isolat positif H5, lajur 3 isolat positif N1.

Data hasil pemeriksaan sampel terduga AI (Tabel 1) mengindikasikan bahwa kasus AI periode Januari 2009 sampai dengan Oktober 2011 di Bali belum dapat ditangani secara tuntas. Hasil konfirmasi uji RT-PCR dengan primer AI subtipe H5N1 menunjukkan, bahwa dari sejumlah kasus yang masuk ke UPT Lab. Biomedika FKH Unud periode tahun 2009, empat kasus positif AI, dua diantaranya berasal dari sampel daging ayam, pada tahun 2010 tidak

Tabel 1. Hasil isolasi dan identifikasi virus AI subtipe H5N1 asal ayam periode 2009-2011

Waktu	Kode sampel	Sampel	Asal kasus	HA/HI	RT-PCR
Januari 2009	6903	Daging Ayam	Denpasar	TD	+
Mei 2009	7112	Daging Ayam	Denpasar	TD	+
Mei 2009	7113	Ayam	Tabanan	+	+
September 2009	8116	Ayam	Badung	+	+
Maret 2011	9828	Daging Ayam	Denpasar	TD	+
Maret 2011	9829	Daging Ayam	Denpasar	TD	+
Juni 2011	9937	Ayam	Tabanan	-	+
Juni 2011	9938	Ayam	Karangasem	+	+
September 2011	A312	Ayam	Badung	+	+
Oktober 2011	A408	Ayam	Tabanan	-	+

Keterangan: TD= sampel tidak diperiksa dengan HA/HI. Konfirmasi diagnosis dengan isolasi pada TAB, uji serologi HA/HI, dan RT-PCR.

ada kasus, sedangkan pemeriksaan sampel periode Oktober 2011 ditemukan enam kasus positif AI, dua di antaranya berasal dari sampel daging ayam.

Adanya virus AI yang terlacak pada sampel daging ayam dalam penelitian ini menunjukkan bahwa daging juga berpotensi sebagai penular virus AI. Kejadian yang sama juga pernah dilaporkan di Korea pada daging itik import asal China yang terinfeksi oleh virus AI subtipe H5N1 (Tumpey *et al*, 2003). Fakta tersebut mengisyaratkan bahwa penjual maupun konsumen daging seyogyanya memahami biosekuriti penanganan kasus AI pada unggas. Biosekuriti yang dimaksud adalah dimulai sejak pemotongan unggas, penjualan, sampai pada konsumen.

Kasus AI di lapangan ternyata masih tetap ada meskipun telah dilakukan tindakan vaksinasi dan biosekuriti yang memadai. Pencegahan terhadap penyakit AI telah dilakukan dengan vaksinasi, baik menggunakan vaksin aktif maupun vaksin inaktif. Vaksin yang terbaik adalah vaksin dengan kandungan agen yang sama dengan virus yang ada lapangan (Mahardika *et al*, 2008), di samping melakukan vaksinasi, upaya penanggulangan penyakit AI juga dengan program bioskuriti yang ketat. Langkah biosekuriti meliputi depopulasi unggas terutama pada daerah tertular didahului dengan *stamplng out*, dilanjutkan dengan pengisian kembali kandang dengan ternak baru yang bebas dari penyakit AI.

Pemantauan terhadap penyakit AI hendaknya dilakukan secara berkesinambungan disertai dengan penyuluhan yang berulang-ulang untuk meningkatkan pemahaman masyarakat akan bahaya penyakitnya. Langkah-langkah antisipasi perlu dilakukan untuk mencegah dampak buruk yang tidak diinginkan yang bisa berakibat fatal, berupa kematian ternak maupun kematian pada manusia. Pemahaman masyarakat akan penyakit AI sangat diperlukan dalam upaya mengatasi ancaman penyakit yang sangat berbahaya ini. Perlu diwaspadai pula bahwa proses penularan virus AI secara cepat banyak terjadi di pasar unggas akibat adanya kontak langsung antar unggas sakit dengan unggas yang sehat. Ayam berperan penting dalam penyebaran virus AI ke manusia dan dapat

bergenerasi menjadi virus influenza baru dengan potensi pandemik (Guo *et al*, 2007).

Cara pemeliharaan unggas terutama pada peternakan rakyat yang semi intensif berpeluang besar dalam proses penularan virus AI. Sistem pemeliharaan ternak yang berbau dalam satu lokasi juga dapat mempercepat proses penyebaran virus AI antar unggas dan penularan ke manusia. Kondisi tersebut menjadi lebih berbahaya apabila di dalam populasi tersebut juga terdapat ternak itik, karena itik dikenal sebagai reservoir virus AI. Itik menyebarkan virus secara terus-menerus tanpa menunjukkan gejala klinis (Hulse-Post *et al*, 2005; Sturm-Ramirez *et al*, 2004).

Kegiatan penyuluhan yang sifatnya intensif sangat menunjang program pemerintah dalam usaha meningkatkan pengetahuan masyarakat akan bahaya penyakit AI. Oleh karena itu peran serta pemerintah sangat besar artinya dalam upaya mengatasi kasus AI di Indonesia.

## SIMPULAN

Berdasarkan atas hasil uji serologi HA/HI yang telah dikonfirmasi dengan uji RT-PCR maka dari 16 sampel yang diperiksa, sepuluh sampel dinyatakan positif AI subtipe H5N1, enam sampel berasal dari kasus lapangan dan empat sampel dari potongan daging ayam. Kajian ini mengindikasikan bahwa penyakit flu burung di Bali masih bersifat endemik.

## SARAN

Mengingat penyakit AI bersifat endemik di Indonesia maka perlu diwaspadai karena penyakitnya bersifat zoonosis mematikan. Kegiatan penyuluhan secara intensif sangat diperlukan untuk meningkatkan pengetahuan masyarakat akan penyakit AI. Penyuluhan sangat penting dilakukan untuk meningkatkan kesadaran masyarakat akan penyakit AI agar Kejadian Luar Biasa (KLB) AI di Indonesia tidak terulang lagi. Tidak kalah pentingnya adalah melakukan pemantauan terhadap perkembangan penyakit AI secara terus-menerus. Peran serta pemerintah sangat menentukan dalam upaya mengatasi kasus AI di Indonesia.

## DAFTAR PUSTAKA

- de Jong MM, Hien TT. 2006. Avian Influenza A (H5N1). *J Clin Virol* 35: 2-13.
- Guo CT, Takahashi N, Yagi H, Kato K, Takahashi T, Yi S-Q, Chen Y, Ito T, Otsuki K, Kida H, Kawaoka Y, Hidari KI-PJ, Miyamoto D, Suzuki T, Suzuki Y. 2007. The quail and chicken intestine have sialyl-galactose sugar chains responsible for the binding of Influenza A viruses to human type receptors. *Glycobiology* 17 (7): 713–724.
- Hulse-Post DJ, Sturm-Ramirez KM, Humberd J, Seller 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. *PNAS* 102 (30) : 10682-10687.
- Invitrogen. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>
- Kandun IN. 2006. Pengendalian penyakit flu burung di Indonesia. Seminar ilmiah Avian Influenza- A global new life threatening disease, UGM
- Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh SK. 2001. Edentification and subtyping of Avian Influenza virus by Reverse Transcription PCR. *J Virol.Meth* 97: 13-22.
- Mahardika IG NK, Sibang M, Suamba M, Adnyana KA, Dewi NMS, Meidiyanti KA, Paulus YA. 2004. Isolasi virus Influenza pada ayam kampung di Bali. *Jurnal Veteriner* 5 (1): 35-45.
- Mahardika IG NK, Wibawan IWT, Suartha IN, Suartini IGAA. 2008. Peningkatan khasiat vaksin untuk penanggulangan flu burung di Indonesia. Laporan Akhir Program Riset Terapan, Kementrian Riset dan Teknologi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar.
- OIE. 2009. Office International des Epizooties (OIE). Terrestrial Manual: Chapter 2.3.4. Avian Influenza. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Helth\\_standars/tahm/2.03.04\\_AI.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Helth_standars/tahm/2.03.04_AI.pdf)
- Salzberg SL, Kingsford C, Cattoli G, Spiro DJ, Janies DA, Aly MM, Brown IH, Couacy-Hymann E, De Mia GM, Dung DH, Guercio A, Joannis T, Ali ASM, Osmani A, Padalino I, Magdi D, Saad MD, Saviaè V, Sengamalay NA, Yingst S, Zaborsky J, Zorman-Rojs O, Ghedin E, Ilaria Capua. 2007. Genome analysis linking recent European and African Influenza (H5N1) viruses. *Emerging Infectious Diseases* 13 (5): 713-718.
- Shankar BP, Sreenivas Gowda RN, Pattnaik B, Manjunatha Prabhu BH, Sreenives BK, Vinuthan MK. Ranjith D, Pradan HK. 2009. Identification and subtyping of Avian Influenza viruses by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Agarose Gel Electrophoresis. *Inter J Poult Sci* 8 (5): 465-469.
- Smith GJD, Naipospos TSP, Nguyen TD, de Jong MD, Vijaykrishna D, Usman TB, Hasan SS, Dao TV, Bui NA, Leung YHC, Cheung CL, Rayner JM, Zhang JX, 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 host in Indonesia and Vietnam. *J Virol* 350: 258–268.
- Sturm-Ramirez KM, Ellis T, Bousfield B, Bissett L, Dyrting K, Rehg JE, Poon L, Guan Y, Peiris M, Webster RG. 2004. Reemerging H5N1 Influenza viruses in Hongkong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *J. Virol.* 78: 4892-4901.
- Swayne DE, Suarez DL. 2000. Highly pathogenic Avian Influenza. *Rev Sci Tech* 19: 463–482.
- Taubenberger JK, Lyne SP. 2001. Diagnosis of Influenza virus: Coming to grips with the molecular era. *Mol. Diagn.* 6: 291-305.
- Tumpey TM, Suarez DL, Perkins LEL, Senne DA, Lee J, Lee YJ, Mo LP, Sung HW, and Swayne DE. 2003. Evaluation of a high-pathogenicity H5N1 Avian Influenza A virus isolated from duck meat. *Avian Dis* 47(3): 951-955.
- WHO/World Health Organization. 2005. Global Influenza program surveillance network. Evolution of H5N1 Avian Influenza in Asia. *Emer Infect Dis.* 11: 1515-1521.
- Wright PE, Webster RG. 2001. Orthomyxoviridae. in *Fields Virology*. 4<sup>th</sup> ed. edited by Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, Straus SE. Philadelphia. Lippincott William Wilkins. Pp. 1533-1568.
- Zhang WD, Evans DH. 1991. Detection and identification of human influenza virus by polymerase chain reaction. *J Virol Meth* 33: 165-189.