

Kesehatan

## LAPORAN

### HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN UNTUK PUBLIKASI INTERNASIONAL

Batch III

Tahun Anggaran 2009



### IMUNOGENISITAS DAN UJI TANTANG SEED VAKSIN VIRUS FLU BURUNG H5N1 STRAIN INDONESIA PADA HEWAN

Oleh

M.Yusuf Alamudi,S.Si,M.Kes

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi,Departemen Pendidikan Nasional,sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian Untuk Publikasi Internasional Batch III Sesuai Prioritas Nasional Nomor :690//SP2H/PP/DP2M/X/2009,Tanggal 26 Oktober 2009

Universitas Airlangga

Desember 2009

49-66/11

## LAPORAN

### HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN UNTUK PUBLIKASI INTERNASIONAL

Batch III

Tahun Anggaran 2009

KK  
KCC  
LP. 66/11  
Ala  
I



### IMUNOGENISITAS DAN UJI TANTANG SEED VAKSIN VIRUS FLU BURUNG H5N1 STRAIN INDONESIA PADA HEWAN

Oleh

M. Yusuf Alamudi, S.Si, M.Kes

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian Untuk Publikasi Internasional Batch III Sesuai Prioritas Nasional Nomor :690//SP2H/PP/DP2M/X/2009, Tanggal 26 Oktober 2009

Universitas Airlangga

Desember 2009

## **SUMMARY**

Avian Influenza was viral disease on the chicken and caused severity from asymptomatic until multisystemic. According WHO, 438 people infected by Avian Influenza virus and 262 was died. At Indonesia, 141 people infected by avian influenza virus and 115 people was died. Vaccine was one alternative for prepare pandemic and also induce antibody and reduction virus after challenge test. The purpose of this research was analysis immunogenicity and challenge test with H5N1 Indonesian strain. Inoculation Egg embryonated chick and MDCK cell culture. The result of this research H5N1 Indonesian strain could induce antibody at animal experiment and challenge test was done.

## **PRAKATA**

Sesuai dengan Surat Perjanjian Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Nomor :690/SP2H/PP/DP2M/V/2009,Tanggal 26 Oktober 2009 bahwa penelitian ini adalah Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi,Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia. Penelitian ini berjudul **IMUNOGENISITAS DAN UJI TANTANG SEED VAKSIN VIRUS FLU BURUNG H5N1 STRAIN INDONESIA** Tujuan Penelitian ini adalah tingkat imunogensitas seed vaksin H5N1 strain indonesia dan analisa uji tantang pada hewan dengan menggunakan virus H5N1 yang bersirkulasi di Indonesia

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya peneliti ucapkan kepada Dirjen DIKTI yang telah memberikan kesempatan untuk mengerjakan penelitian ini sehingga bisa terselesaikan dengan baik. Dan peneliti menerima saran yang membangun sehingga penelitian-penelitian selanjutnya dapat berjalan lebih baik.

**Surabaya, 11 Desember 2009**

**Peneliti**

**DAFTAR ISI**

<b>LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....</b>	<b>i</b>
<b>A. LAPORAN HASIL PENELITIAN</b>	
<b>RINGKASAN DAN SUMMARY.....</b>	<b>ii</b>
<b>PRAKATA.....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>I. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>2</b>
<b>III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE.....</b>	<b>9</b>
<b>IV. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>9</b>
<b>V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>11</b>
<b>VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>17</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	
<b>LAMPIRAN</b>	

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Sel MDCK mulai Terinfeksi Virus Flu Burung H5N1.....	11
Gambar 2 Hasil PCR dengan Primer Specifik untuk HA.....	12
Gambar 3 Hasil PCR dengan Primer Specifik untuk NA.....	13
Gambar 4 Alignment Asam amino Protein Hemagglutinin (HA) dari inokulasi Virus pada sel MDCK.....	14
Gambar 5. Alighment Asam amino Protein Hemagglutinin (HA) dari inokulasi Virus pada TAB.....	15

**DAFTAR TABEL**

Tabel 1 Hasil Pengujian HA pada Telur dan Sel MDCK.....	12
Tabel 2 Titer Virus Neutralisasi pada Mencit setelah vaksinasi.....	16
Tabel 3. Titer Antibodi setelah dilakukan Uji Tantang.....	16

## 1.1 Pendahuluan

Avian Influenza adalah penyakit viral pada unggas, termasuk ayam dan unggas liar yang disebabkan oleh virus influenza type A. Penyakit ini dikenal juga dengan nama avian flu dan dapat menimbulkan penyakit dengan derajat keparahan yang sangat bervariasi, mulai dari infeksi yang bersifat asimtomatik sampai penyakit fatal dan bersifat multisistemik (Swayne, 2000).

Sejak akhir tahun 2003, virus *avian influenza* subtype H5N1 telah menyebar di peternakan unggas beberapa negara Asia termasuk China, Vietnam, Thailand, Kamboja, Korea, Jepang dan Indonesia, beberapa negara di Eropa dan Afrika (Steven *et al* 2006). Di Indonesia, telah terjadi kematian ayam sebanyak 4,7 juta ekor, bahkan sampai dengan akhir Februari 2004, kematian unggas tercatat sebanyak 6,2 juta ekor. Daerah yang terserang flu burung kebanyakan berada di Pulau Jawa, yaitu Propinsi Jawa Timur (13 kabupaten), Jawa Tengah (17 kabupaten), Jawa Barat (6 kabupaten), Banten (1 kabupaten), Daerah Istimewa Yogyakarta (3 kabupaten). Sedangkan daerah di luar Pulau Jawa yang juga terserang penyakit ini diantaranya adalah Bali (5 kabupaten), Lampung (3 kabupaten), Kalimantan Selatan (1 kabupaten), Kalimantan Timur (1 kabupaten) dan Kalimantan Tengah (1 kabupaten) (Raharjo dan Nidom, 2004). Selain pada unggas, virus *avian influenza* dapat pula menyerang mamalia termasuk manusia. Lebih dari 400 orang telah dilaporkan terinfeksi dengan virus avian influenza subtype H5N1 dan 262 diantaranya meninggal dunia. Di Indonesia, angka orang yang terinfeksi virus flu burung sebanyak 141 orang sampai dengan 11 Agustus 2009 dan 115 orang diantaranya meninggal (WHO, 2009). Vaksin merupakan salah satu tindakan pencegahan secara preventif untuk menghadapi pandemik. Oleh sebab itu kajian



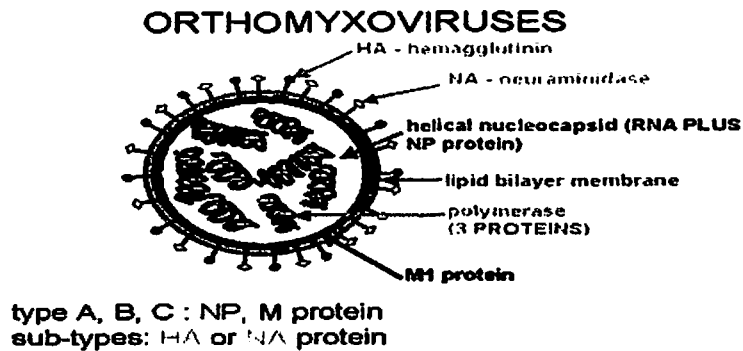
tentang tingkat imunogenisitas seed vaksin H5N1 strain Indonesia sangat dibutuhkan dan juga uji tantangan dengan berbagai virus H5N1 di Indonesia juga sangat dibutuhkan untuk mengetahui daya kemampuan seed vaksin ini dalam menghadapi terjadinya pandemik.

## II. STUDI PUSTAKA

### 2.1 Influenza A

Virus Influenza terdapat tiga tipe yaitu tipe A, B dan tipe C. Virus avian influenza atau yang lebih dikenal dengan virus Flu Burung termasuk dalam virus influenza tipe A dan family *Orthomyxoviridae* (Horimoto dan Kawaoka, 2001). Genom virus influenza tipe A berupa rantai untai tunggal, sense negatif, sepanjang kurang lebih 13.588 nukleotida yang tersusun dalam 8 segmen yang menyandi 10 macam protein. Kedelapan segmen tersebut adalah PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M (M1 dan M2) serta NS (NS1 dan NS2) (Horimoto dan Kawaoka, 2001; Whittaker, 2001). Virus ini mempunyai amplop dengan *lipid bilayer* yang berasal dari hospes dan ditutupi dengan sekitar 500 tonjolan glikoprotein yang mempunyai aktifitas hemaglutinasi dan neuraminidase. Aktifitas ini diperankan oleh 2 glikoprotein utama pada permukaan virus yaitu hemaglutinin (HA) dan (NA) yang berada dalam bentuk homotrimer dan homotetramer. Analisis serologik dan genetik pada virus Flu Burung dapat diketahui adanya 16 macam HA dan 9 macam NA (Donatelli *et al*, 2001; Dybing *et al* 200; Hoffman *et al*, 2000, Swayne, 2004). Diantara virus Flu Burung yang sering menimbulkan penyakit serius pada unggas terutama adalah yang mempunyai hemaglutinin H5, H7 dan kadang-kadang H9. Susunan asam amino protein HA, NA serta protein NS dan PB2 ikut berperan dalam sifat antigenik, virulensi dan spesifitas virus terhadap hospes. Kemampuan virus Flu Burung untuk

melakukan mutasi dan reassorpsi genetik memungkinkan virus untuk berubah sifat antigeniknya, patogenisitasnya serta spesifitas hospesnya (Asmara, 2005).



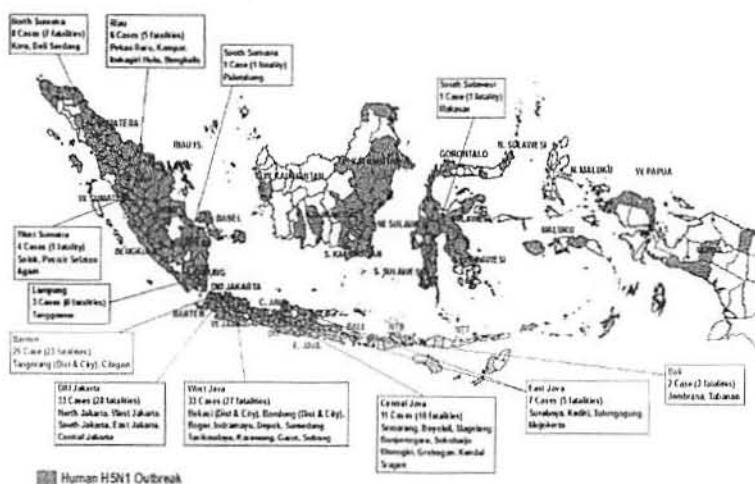
Gambar 2.1 Struktur virus Influenza A (Suarez, 2004)

Variasi antigenik pada virus Flu Burung dapat ditemukan frekuensi tinggi dan terjadi melalui 2 cara yaitu antigenic shift dan antigenic drift. Antigenic shift dapat timbul akibat gene reassortment (pertukaran atau pencampuran gen) yang terjadi pada 2 atau lebih virus influenza type A sehingga terjadi penyusunan kembali suatu galur virus baru yang bermanifestasi sebagai subtype virus Flu Burung baru. Antigenic shift terjadi oleh adanya perubahan struktur antigenik yang bersifat dominan pada antigen permukaan H dan atau N. Antigenic drift dapat terjadi oleh adanya perubahan struktur antigenik yang bersifat minor pada antigen permukaan H dan atau N dan dapat ditemukan pada virus influenza type A dan B. Antigenic drift berlangsung lambat, tetapi progresif dan cenderung menimbulkan penyakit yang terbatas pada suatu daerah/domain. Mutasi pada materi genetik dapat menimbulkan perubahan polipeptida virus, yaitu sekitar 2-3 kali substitusi asam amino per tahun (Capua *et al*, 2000; Tumpey *et al*, 2002; Swayne dan Suarez, 2003).

**2.1 Epidemiologi Virus Flu Burung Subtipe H5N1 Pada Unggas Dan Manusia**

**2.1.1 Epidemiologi Virus Flu Burung Subtipe H5N1 Pada Unggas**

Flu burung atau juga dikenal sebagai avian influenza merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus influenza tipe A (CDC, 2004; US Department of Labor, 2004; WHO, 2004; Omi, 2005; WHO, 2005; Behrens and Stoll, 2006). Hingga saat ini, wabah flu burung dengan patogenisitas yang tinggi (*highly pathogenic*), disebabkan oleh virus influenza subtipe H5 dan H7 (Swayne and Suarez 2000; Behrens and Stoll, 2006; Harder and Werner, 2006). Flu burung *highly pathogenic* untuk pertama kalinya dikenal sebagai penyakit infeksi yang terjadi pada burung, unggas dan ayam di Itali pada tahun 1878 (Harder and Werner, 2006). Meskipun flu burung *highly pathogenic* jarang sekali ditemukan menginfeksi manusia (US Department of Labor, 2004), akan tetapi WHO (2004) mengemukakan bahwa flu burung juga dapat menginfeksi dan menyebabkan kematian pada mamalia dan manusia.



Gambar 2.2 Daerah endemis virus Flu Burung Subtipe H5N1 di Seluruh Indonesia (Sumber WHO, 2008)

Flu burung terjadi di Indonesia sejak pertengahan tahun 2003, akan tetapi baru pada 25 Januari 2004, Pemerintah mengumumkan secara resmi kepada masyarakat Indonesia bahwa telah terjadi wabah flu burung pada ayam dan unggas lainnya seperti ayam petelur, ayam bibit, ayam pedaging, bebek dan burung puyuh. Berdasarkan laporan resmi tersebut, telah terjadi kematian ayam sebanyak 4,7 juta ekor, bahkan sampai dengan akhir Februari 2004, kematian unggas tercatat sebanyak 6,2 juta ekor. Daerah yang terserang flu burung kebanyakan berada di Pulau Jawa, yaitu Propinsi Jawa Timur (13 kabupaten), Jawa Tengah (17 kabupaten), Jawa Barat (6 kabupaten), Banten (1 kabupaten), Daerah Istimewa Yogyakarta (3 kabupaten). Sedangkan daerah di luar Pulau Jawa yang juga terserang penyakit ini diantaranya adalah Bali (5 kabupaten), Lampung (3 kabupaten), Kalimantan Selatan (1 kabupaten), Kalimantan Timur (1 kabupaten) dan Kalimantan Tengah (1 kabupaten) (Raharjo dan Nidom, 2004).

### **2.3 Epidemiologi Virus Flu Burung Subtipe H5N1 Pada Manusia**

Wabah flu burung pada manusia pertama kali ditemukan di Hongkong. Selama wabah tersebut terjadi, diketahui bahwa terdapat 18 orang pasien menderita flu burung dan 6 orang meninggal karena terinfeksi flu burung. Kemudian pada tahun 2003, terjadi 2 kasus flu burung yang menginfeksi keluarga dari Hongkong yang sedang berada di Cina, dimana 1 orang dilaporkan sembuh sedangkan yang lainnya meninggal (Dybing *et al.*, 2000; US Department of Labor, 2004; WHO, 2004). Kasus infeksi virus flu burung pada manusia dilaporkan telah menyebar di Azerbaijan, Kamboja, Cina, Mesir, Indonesia, Irak, Thailand, Turki dan Vietnam (CDC, 2004; WHO, 2004; WHO, 2005). Di Indonesia, kasus flu burung pada manusia pertama kali ditemukan di kota Tangerang, propinsi Banten. Berdasarkan hasil konfirmasi dari laboratorium rujukan WHO di Hongkong, Pemerintah

Indonesia melaporkan bahwa kejadian meninggalnya keluarga yang terdiri dari Bapak dan 2 orang anak yang berasal dari Tangerang, Propinsi Banten disebabkan oleh infeksi virus flu burung. Menteri Kesehatan mengemukakan bahwa telah terjadi infeksi virus avian influenza H5N1 pada manusia, tiga dari kasus ini berakibat fatal.

Infeksi virus avian influenza H5N1 diketahui menyebar secara geografis. Satu kasus terbaru adalah kasus infeksi yang terjadi pada seorang laki-laki dari propinsi Jawa Timur yang berusia 18 tahun. Pada kasus tersebut, gejala klinis mulai berkembang pada tanggal 6 Mei dan baru dirawat di rumah sakit pada tanggal 17 Mei; saat ini laki-laki tersebut dilaporkan telah sehat kembali. Dua kasus lainnya terjadi pada seorang gadis berusia 10 tahun dan saudara laki-lakinya yang berusia 18 tahun; keduanya berasal dari Bandung. Gejala klinis pada keduanya berkembang pada tanggal 16 Mei, dan kemudian mereka dirawat di rumah sakit pada 22 Mei, dan meninggal pada 23 Mei.

Pada kasus tersebut, kebanyakan individu yang terinfeksi virus avian influenza H5N1 mempunyai hubungan yang dekat dengan ayam atau unggas yang mati di sekitar rumah tempat tinggal mereka sebelum gejala klinis mulai berkembang (Depkes RI, 2006). Berbagai kasus infeksi virus avian influenza H5N1 terus berkembang dan hingga tanggal 11 Agustus 2009 dilaporkan bahwa lebih dari 400 kasus infeksi virus avian influenza H5N1 pada manusia dan jumlah korban yang meninggal akibat infeksi virus Flu Burung subtipe H5N1 sebanyak 262 orang (WHO, 2009).

**Tabel 2.3 Jumlah orang yang terinfeksi oleh virus Flu Burung Subtipe H5N1 per tanggal 11 Agustus 2009**

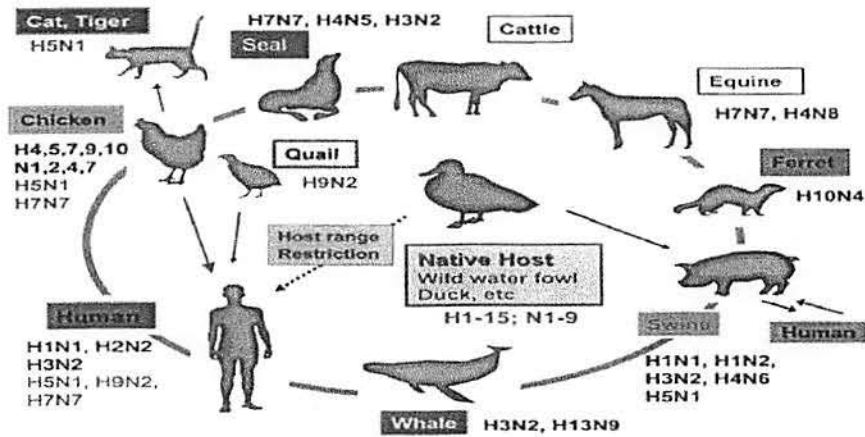
Country	2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009		Total	
	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths	cases	deaths
Azerbaijan	0	0	0	0	0	0	8	5	0	0	0	0	0	0	8	5
Bangladesh	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
Cambodia	0	0	0	0	4	4	2	2	1	1	1	0	0	0	8	7
China	1	1	0	0	8	5	13	8	5	3	4	4	7	4	38	25
Djibouti	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Egypt	0	0	0	0	0	0	18	10	25	9	8	4	32	4	83	27
Indonesia	0	0	0	0	20	13	55	45	42	37	24	20	0	0	141	115
Iraq	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	3	2
Lao People's Democratic Republic	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	2	2
Myanmar	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Nigeria	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
Pakistan	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	3	1
Thailand	0	0	17	12	5	2	3	3	0	0	0	0	0	0	25	17
Turkey	0	0	0	0	0	0	12	4	0	0	0	0	0	0	12	4
Viet Nam	3	3	29	20	61	19	0	0	8	5	6	5	4	4	111	56
Total	4	4	46	32	98	43	115	79	88	59	44	33	43	12	438	262

## 2.4 Penularan Penyakit flu burung H5N1

Virus flu burung dapat terbawa di dalam saluran gastrointestinal burung liar ke seluruh dunia. Virus ini sangat berbahaya dan dapat menyebar di dalam saliva, cairan yang dikeluarkan melalui hidung dan feses dari burung yang terinfeksi H5N1. Virus flu burung secara normal asimtomatis pada burung liar tetapi dapat menyebabkan kematian pada ayam, bebek dan kalkun. Burung yang dipelihara dapat terinfeksi melalui kontak langsung dengan burung yang terinfeksi (antara burung liar dan burung yang dipelihara) atau melalui kontak dengan tanah yang terkontaminasi, sangkar dan air atau melalui makanan yang terkontaminasi dengan virus flu burung. Sebuah penelitian menemukan bahwa virus flu burung H5N1 dapat disebarkan melalui burung yang bermigrasi di daerah Asia Tenggara (Galwankar dan Clem, 2006). Selain burung liar, anjing dan kucing memiliki potensi dalam menyebarkan virus flu burung subtipe H5N1. Ini didasarkan hasil penelitian dari tim FKH-UGM menemukan 2 ekor anjing dan kucing positif terhadap infeksi flu burung subtipe H5N1 (Asmara, 2007). Selain itu, menurut hasil penelitian yang dilakukan di 6 kota di Indonesia ditemukan prevalensi kucing yang terinfeksi oleh virus flu burung subtipe H5N1 adalah sebesar 19,8 % dari 500 kucing (Nidom, 2006). Virus influenza dapat ditularkan melalui kontak dengan permukaan dan bahan yang terkontaminasi dengan virus flu burung atau melalui hospes perantara seperti babi. Karena manusia jarang terpapar oleh virus flu burung maka manusia memiliki imunitas yang sedikit terhadap partikel virus ini di dalam populasi yang besar. Ini menyebabkan virus flu burung menjadi ganas apabila terjadi penularan antar manusia dan dapat menyebabkan pandemik.

Kasus flu burung pada manusia paling banyak terjadi pada anak-anak dan orang dewasa dan lebih dari separuhnya meninggal akibat komplikasi yang disebabkan oleh virus ini. Ini disebabkan individu yang terinfeksi oleh virus flu burung memiliki gejala

klinis yang berbeda dengan gejala yang ditimbulkan oleh virus flu burung (Galwankar dan Clem, 2006).



**Gambar 2.3** Jalur penularan virus flu burung pada unggas dan manusia (Robertson, 2006)

### III. Tujuan dan Manfaat Penelitian

#### 3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan Penelitian ini adalah

1. analisa tingkat imunogenisitas seed vaksin H5N1 strain indonesia pada berbagai hewan coba.
2. analisa ujiantang terhadap seed vaksin H5N1 strain indonesia dengan virus H5N1 yang bersirkulasi di Indonesia pada hewan coba.

#### 3.2 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah menganalisis imunogenisitas seed vaksin H5N1 strain Indonesia sehingga bisa digunakan sebagai vaksin pre-pandemik.



#### **IV. METODE PENELITIAN**

##### **A) Inokulasi Medium Transport pada Telur Ayam Bertunas (TAB)**

Tempatkan telur pada sisi tumpul bagian atas dan diberi kode. Usap bagian atas telur dengan menggunakan 70 % ethanol dan buat lubang pada batas ruang udara dan ruang alantois. Ambil 1 ml spesimen dari medium transport dengan menggunakan syringe. Pegang telur, tentukan lokasi embrio dengan menggunakan “*egg candler*”, masukkan jarum ke lubang pada telur, menembus membran amnion, dan inokulasikan 100 µl spesimen ke ruang amnion. Tarik jarum 0,5 cm dan inokulasikan 100 µl spesimen ke dalam ruang alantois. Tutup lubang telur dengan parafin cair dan inkubasi telur tersebut pada suhu 33-37 °C selama 2-3 hari.

##### **B) Metode Uji HA**

Masukkan 50 ml PBS pada lubang A2-H12 kemudian masukkan 100 µl control antigen atau isolat lapangan dari A1-F1. Pindahkan 50 ml dari lubang pertama s/d terakhir kemudian tambahkan RBC guinea pig (Marmot) 0,75 %, shake dg mekanikal vibrator dan Inkubasi dalam suhu ruang.

##### **C) Uji PCR**

Ekstraksi RNA dari cairan alantois mengikuti prosedur dari Qiagen RNAeasy TM RNA Isolation Kit. Reaksi PCR dalam mendeteksi virus Flu Burung subtipe H5N1 yaitu untuk proses denaturasi 94 °C selama 1 menit, annealing 50 °C selama 1 menit dan extension selama 3 menit. Siklus PCR antara 25 sampai dengan 40 siklus kemudian hasil produk PCR dianalisis di dalam Elektroforesis dan difoto untuk analisis hasil.

##### **D) DNA Sequencing**

DNA dari masing-masing isolat, setelah dimurnikan urutan DNA ditentukan dengan menggunakan mesin ABI Prism 310 Genetic Analyser, yang terdapat di

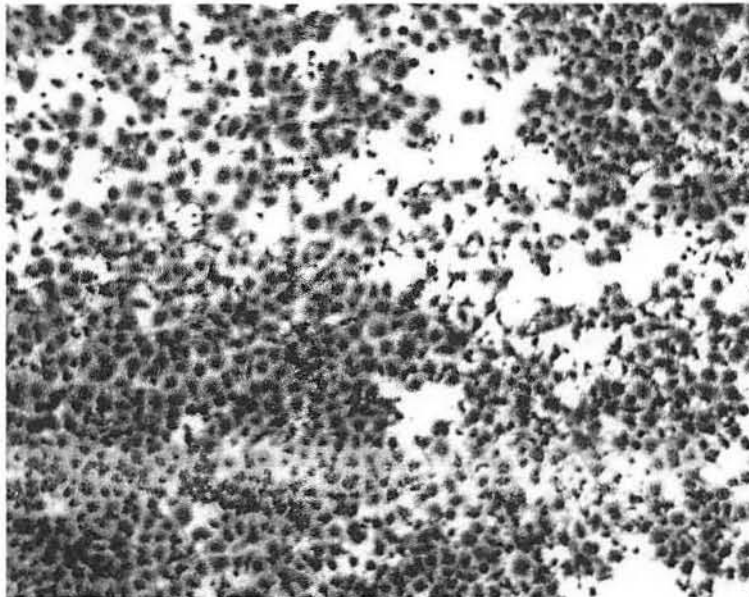
Tropical Disease Center - Universitas Airlangga dengan menggunakan Big Dye Terminator (Perkin Elmer Cetus) dan dinalisa tingkat *homology* dengan menggunakan data dari gen bank.

### E) Uji Tantang

Seed vaksin H1N1 strain meksiko diinfeksi pada hewan coba. Observasi selama 14 hari. Pengambilan darah dilakukan tiap 3,7,12 dan 14 hari. Pada hari ke-15, hewan coba diinfeksi dengan menggunakan virus H1N1 strain meksiko yang beredar di Indonesia

### V. Hasil Dan Pembahasan

Virus Avian Influenza subtype H5N1 diinokulasikan pada Telur Ayam Berembrio berumur 9 hari, diinkubasi sampai dengan embrio mati atau paling lama diinkubasi selama 4 hari. Virus ini juga diinokulasikan pada sel MDCK



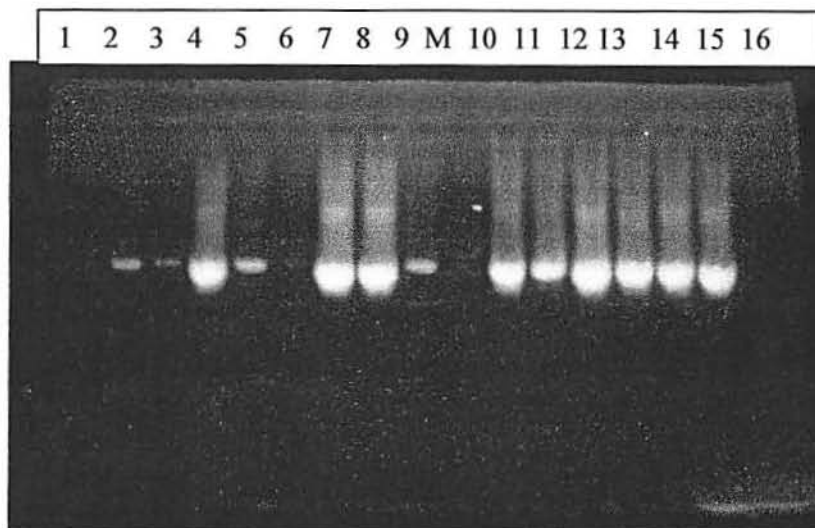
**Gambar 1 Sel MDCK mulai Terinfeksi Virus Flu Burung H5N1**

Setelah dilakukan pemanen terhadap cairan alantois dan supernatan pada sel MDCK maka dilakukan pengujian untuk mengetahui titer aktifitas Haemaglutinasi. Aktifitas terhadap Haemagglutinas pada cairan alantois dan supernatan adalah sebagai berikut :

Tabel 1 Hasil Pengujian HA pada Telur dan Sel MDCK

Konsentrasi Virus Flu Burung				
$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
<i>Telur Ayam Berembrio</i>				
$2^8$	$2^7$	$2^8$	$2^8$	$2^7$
<i>Sel MDCK</i>				
$2^8$	$2^7$	$2^6$	$2^6$	$2^5$

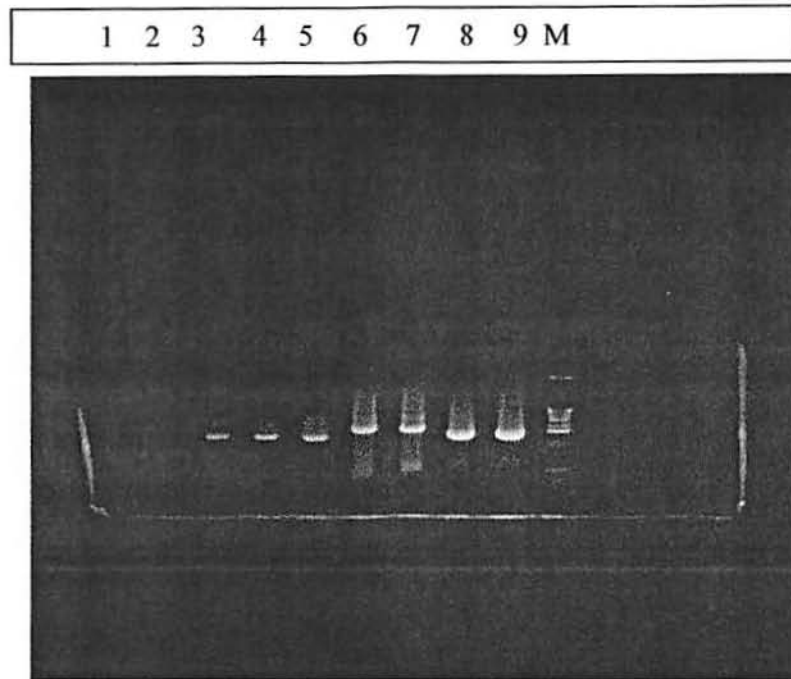
Hasil Identifikasi gen Hemagglutinin (HA) dan NA (Neuraminidase) dengan Metoda RT-PCR sebagaimana tertera pada Gambar 2 dibawah ini :



**Gambar 2 Hasil PCR dengan Primer Spesifik untuk HA**

( M = Marker; 1=Kontrol positif; 2-15 = Sampel Virus Flu Burung; 16 = Kontrol negatif)

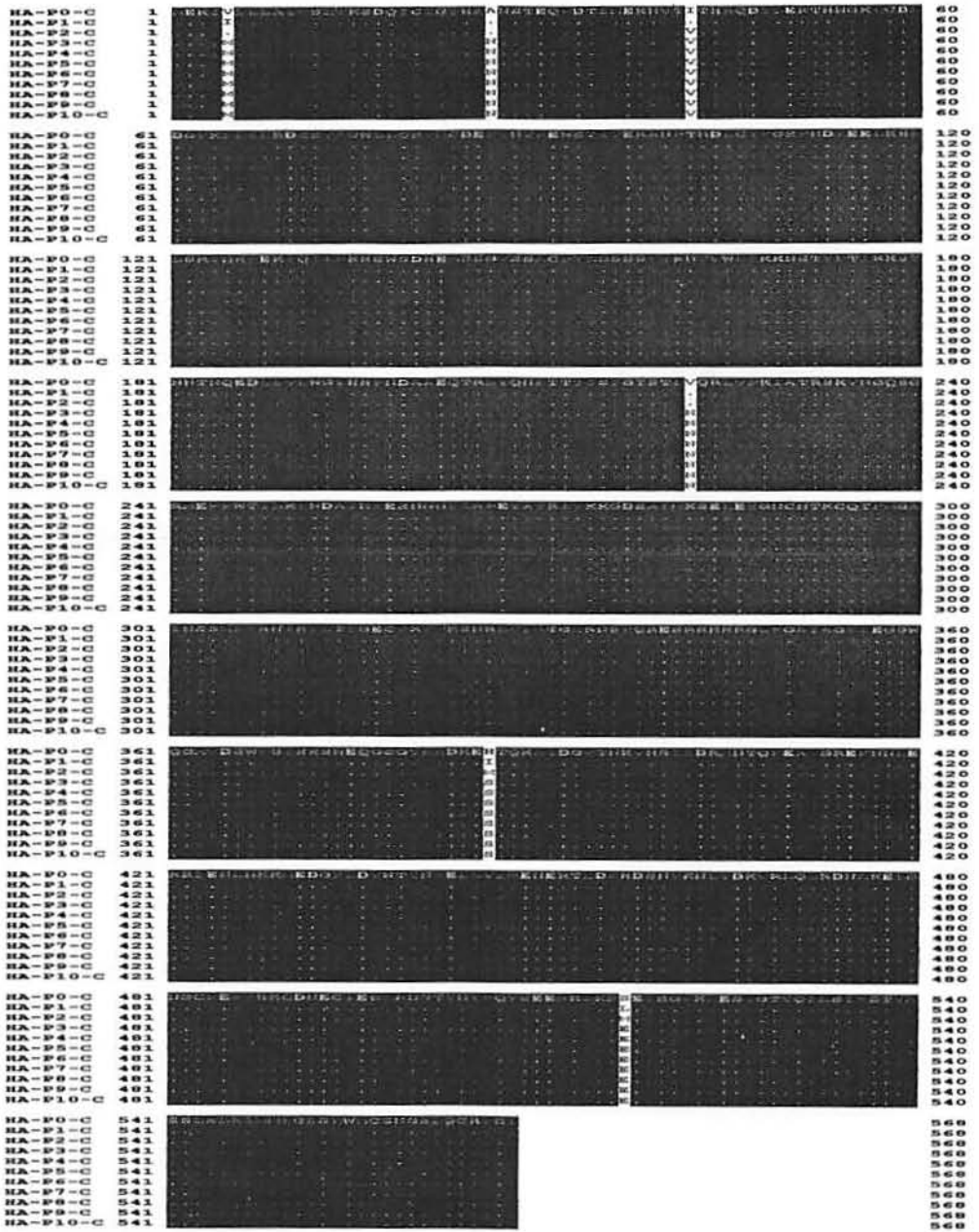
Selanjutnya hasil PCR tersebut dimurnikan dan dilakukan sequencing untuk mengetahui urutan DNA dan perkiraan urutan asam aminonya.



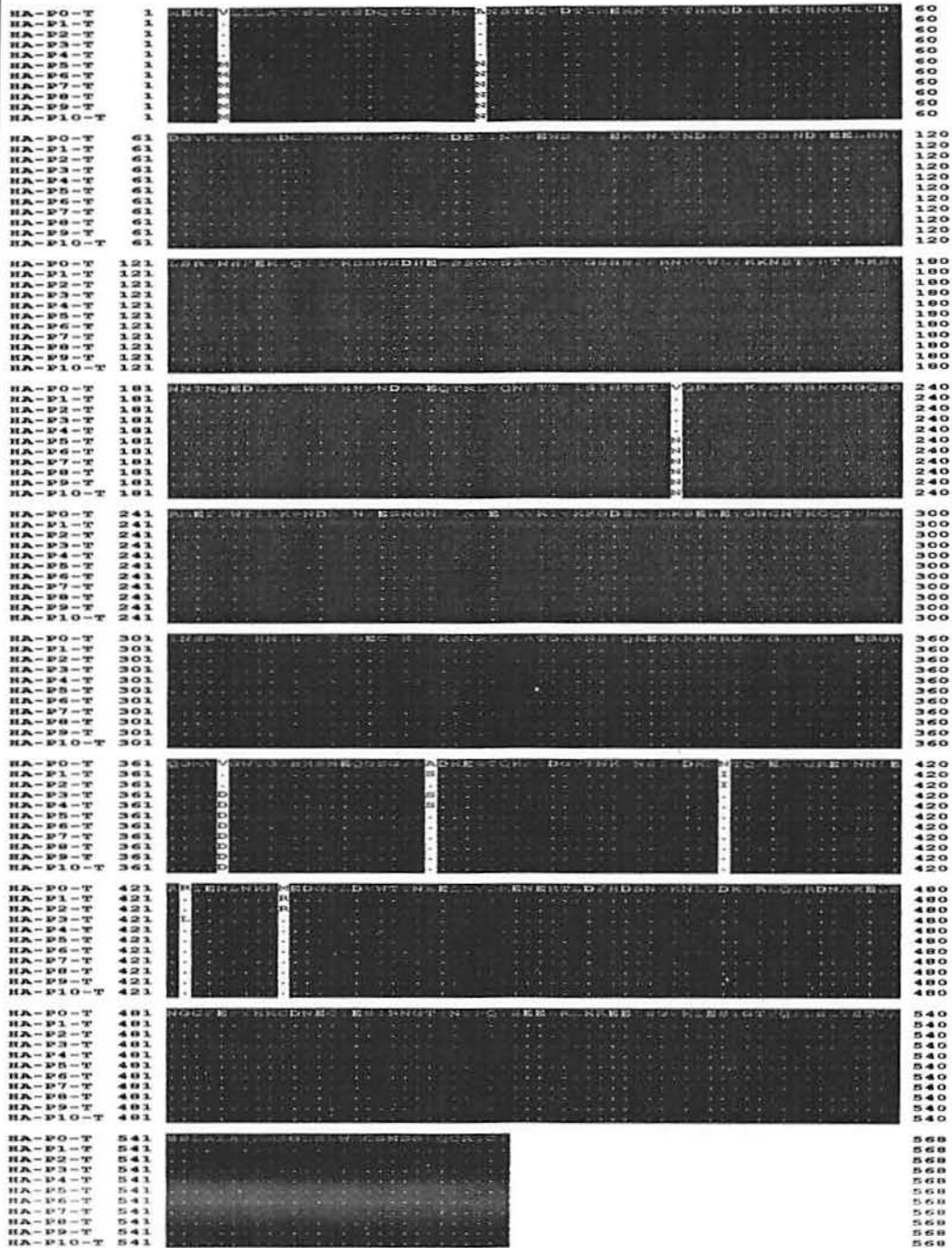
**Gambar 3 Hasil PCR dengan Primer Spesifik untuk NA**

( M = Marker; 1-9 = Sampel Virus Flu Burung)

Uji Kestabilan terhadap mutasi yang dilakukan terhadap struktur virus dilakukan pada Telur Ayam Berembrio maupun sel MDCK. Masing-masing pasase dilakukan analisis mutasi asam amino struktur virus. Berikut di bawah ini merupakan hasil analisis masing-masing pada protein penyusun struktur virus.



**Gambar 4** Alignment Asam amino Protein Hemagglutinin (HA) dari inokulasi Virus pada sel MDCK



Gambar 5. Alignment Asam amino Protein Hemagglutinin (HA) dari inokulasi Virus pada TAB

Berdasarkan pengujian terhadap imunogenisitas isolat virus H5N1 pada hewan coba untuk mengetahui respon antibodi maka dilakukan pengujian dengan menggunakan netralisasi tes dan uji HI. Titer merupakan hasil dari hasil terbalik dari nilai terendah yang telah menghambat 100 TCID<sub>50</sub> dari virus tersebut. Hasil perhitungan titer Virus Neutralisasi dapat dilihat pada Tabel 2 dibawah ini : .

**Tabel 2 Titer Virus Neutralisasi pada Mencit setelah vaksinasi**

<b>Dosis</b>	<b>Serum Ulangan</b>	<b>Mencit</b>
<b>5 ug</b>	<b>1</b>	<b>1.280</b>
	<b>2</b>	<b>2.560</b>
	<b>3</b>	<b>1.280</b>
	<b>4</b>	<b>1.280</b>
	<b>5</b>	<b>1.280</b>
<b>1 ug</b>	<b>1</b>	<b>640</b>
	<b>2</b>	<b>640</b>
	<b>3</b>	<b>640</b>
	<b>4</b>	<b>640</b>
	<b>5</b>	<b>640</b>

Hasil yang ditunjukkan dari Uji Virus Neutralisasi dari serum mencit menunjukkan titer yang tinggi. Hasil yang diperoleh ini menunjukkan resepon yang sama baik antara hewan sederhana seperti mencit, maupun hewan mamalia, seperti ferret.

Sementara itu, hasil pengujian antibody setelah dilakukan uji tantang dengan isolat lapangan didapatkan serum menunjukkan hasil yang berbeda antara perlakuan hewan maupun dosis yang digunakan. Hasil pengujian titer antibody serum setelah dilakukan uji tantang dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3. Titer Antibodi setelah dilakukan Uji Tantang**

<b>Dosis</b>	<b>Ulangan</b>	<b>Mencit</b>
<b>5 ug</b>	<b>1</b>	<b>160.000</b>
	<b>2</b>	<b>130.500</b>
	<b>3</b>	<b>90.000</b>
	<b>4</b>	<b>120.000</b>
	<b>5</b>	<b>95.000</b>
<b>Rata-rata</b>		<b>119.100</b>

1 ug	1	25.000
	2	12.000
	3	16.000
	4	30.000
	5	17.500
<b>Rata – Rata</b>		<b>20.100</b>

## VI. Kesimpulan Dan Saran

### 6.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah didapatkan isolat virus H5N1 strain indonesia dapat digunakan sebagai seed virus untuk produksi vaksin sehingga dapat dijadikan vaksin pre-pandemik.

### 6.2 Saran

Saran dari penelitian ini adalah perlu adanya penelitian lanjutan tentang teknik penambahan adjuvan dan jalur utk memvaksinasi sehingga didapatkan titer antibodi yang lebih protektif.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alamudi MY, et al.2008. H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses Serosurvey on Poultry Workers In Indonesia. Asian-African Research Forum On Emerging and Re-Emerging Infection, December 15-16,2008 Sapporo Japan
- Alshawsh MA, et al. 2007. Assessment of antimalarial activity against Plasmodium falciparum and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants eCAM p 1-4
- De Jong,M.D,et al.2005.Oseltamivir Resistance during Treatment of Influenza A (H5N1) Infection .N Engl J Med Vol. 353: 2667-72
- De Jong, M.D dan Hien T.T., 2006. Review Avian Influenza A (H5N1). Journal Of Clinical Virology 35 pp 2-13
- Dybing JK., Schultz S-Cherry, Swayne DE., Suarez DL. and Perdue ML., 2000. Distinct Pathogenesis of Hong Kong-Origin H5N1 Viruses in Mice Compared



- to That of Other Highly Pathogenic H5 Avian Influenza Viruses. *Journal of Virology*. South East Poultry Research Laboratory. Georgia.
- Donateli, L., Campitelli, L., and Trani, L., 2001. Characterization of H5N2 influenza viruses from Italian Poultry, *J. Gen. Virol.* 82 : 623-630
- Elfahmi.2006. Phytochemical and Biosynthetic Studies of Lignans with a Focus on Indonesian Medicinal Plants. *Facilitair Bedrijf, University of Groningen, the Netherlands*.thesis.
- Hao L., Sakurai A., Watanabe T., Sorencen E., Nidom C..A., Newton,M.A., Kawaoka Y. 2008. *Drosophila* RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature*,.vol.524.:64-73.
- Hoffman E, *et al.* 2005. Role Of Specific Hemagglutinin Amino Acids In The Immunogenicity And Protection Of H5N1 Influenza Virus Vaccine. *PNAS* Vol 102 No 36 pp 12915-12920.
- Horimoto T. and Kawaoka Y., 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.*
- Nidom C.A. 2005. Analisis Molekuler Virus Avian Influenza H5N1 di Indonesia. *Disertasi. Universitas Airlangga.*
- Nidom CA., Dachlan YP., Zarkasie K.2006. Surveilans of Avian Influenza Virus subtype H5N1 on the Pig and Cat, Phylogenetic analysis of Avian Influenza virus which infected on the chicken and human, National Education Ministry.
- Raharjo J. dan Nidom CA., 2004. Avian Influenza : Pencegahan, Pengendalian dan Pemberantasannya. Hasil Investigasi Kasus Lapangan. Gita Pustaka.
- Revianny V. Nidom, et al. 2008. Surveillance of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in Indonesia. *Asian-African Research Forum On Emerging and Re-Emerging Infection*, December 15-16,2008 Sapporo Japan
- Suarez DL., Perdue ML., Cox N., Rowe T., Bender C., Huang J. and Swayne DE., 1998. Comparisons of Highly Virulent H5N1 Influenza Viruses Isolated from Humans and Chickens from Hong Kong. *J. Virol.*
- Swayne, D.E. 2004. Avian influenza, vaccine and control. *Poultry Sci.*83:79-81
- Swayne, D.E., and Suarez, D.L. 2003. Biology of avian influenza especially the change of low pathogenicity virus to high pathogenicity. *Proc.Latin American Poultry Congress*. Oct.7, 2003
- Tumpey, T.M., Suarez, D.L., Perkin, L., L., L., Senne, D.A., Lee, J.G., Lee, Y.J., Mo, L.P., H.W., and Swayne, D.E., 2002. Characterization of a highly pathogenic

**H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat. J.Virol 76 (12):6344-6255**

**WHO, 2009, Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO March 11 2009 <http://www.who.int>**

## **Lampiran**

### **Sarana Dan Prasarana yang digunakan pada penelitian**

Sarana dan fasilitas laboratorium yang diperlukan lengkap dan menunjang seratus persen kegiatan penelitian ini.

#### **Laboratorium :**

Laboratorium Avian Influenza, Tropical Disease Center, Universitas Airlangga, Surabaya.

#### **Peralatan Utama yang dimiliki :**

1. Ultra Centrifuge
2. Centrifuge
3. Inkubator CO<sub>2</sub>
4. Lemari Es -80° C dan -20° C
5. Mikropipet
6. PCR
7. Mesin Sequencing
8. BSL-3 dan Animal BSL-3

**BIOGRAFI / DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI**

**Nama Lengkap** : Mohammad Yusuf Alamudi, S.Si, M.Kes  
**N IK** : 139080880  
**Tempat/Tanggal Lahir:** Surabaya, 21 Januari 1980  
**Jenis Kelamin** : Laki-laki  
**Bidang Keahlian** : Penyakit Tropis  
**Kantor/Unit Kerja** :ITD-Laboratorium Avian Influenza Universitas Airlangga  
**Alamat Kantor** : Kampus C Universitas Airlangga Jl. Mulyorejo  
**Kota** : Surabaya **Kode Pos** : 60155  
**Telepon** : ( 031) 5992445-6 )  
**Faksimile** : ( 031) 5992445 )  
**E-Mail** : tdrdua@rad.net.id  
**Alamat Rumah** : Jl. Simolawang 6/10  
**Kota** : Surabaya **Kode Pos** : 60143  
**Telepon** : (031-3723506 )  
**Faksimile** : ( - )  
**E-Mail** : ucupalam@yahoo.com  
**No. Telepon Genggam** : 081803210936

**Pendidikan (S1 ke atas)**

No	Perguruan Tinggi	Kota & Negara	Tahun Lulus	Bidang Studi
1	Universitas Airlangga	Surabaya, Indonesia	2007	S2- Ilmu Kedokteran Tropis
2	Universitas Airlangga	Surabaya, Indonesia	2003	S1-Biologi

**PENGALAMAN RISET****National Publication**

1. Detection of Avian Influenza Virus Subtype H5N1 with Real Time PCR and Novel Rapid Test in the Chicken, Pig and Human sample, National Seminar Of Indonesia Biochemistry and Molecular biology (PBBMI) Jakarta Desember 6, 2006 (Author ).

2. Analysis Phylogenetic of Haemagglutinin Avian Influenza Virus Which Infected Pig In Indonesia, National Seminar Of Indonesia Biochemistry and Molecular biology (PBBMI) Jakarta Desember 6, 2006 (Co-Author).
3. Detection Antibody to Avian Influenza Virus Subtype H5N1 on the cat sera (*Felis silvestris catus*) With Combination Serologic Test, Seminar of Indonesian Microbiology Association Banjarmasin September 1-2, 2007 (Co-Author).
4. Isolation and Characterization Avian Influenza Virus subtype H5N1 on the Wild Cat (*Felis silvestris catus*) By Novel Rapid Test and Real-Time PCR, Seminar of Indonesian Microbiology Association Banjarmasin September 1-2, 2007 (Co-Author).
5. Antibody Titre Of Domestic Chicken (*Gallus Domesticus*) Post Vaccination Of Avian Influenza With Homologue H5N1 Vaccine and Heterologue H5N2 Vaccine, Seminar of Indonesian Microbiology Association Surabaya, Juli 12, 2008 (Co-Author)
6. Comparison Antibody Titer of Chicken After Treatmen With Conventional Vaccine H5N1 And Reverse Genetic of Avian Influenza H5N1 Seminar of Indonesian Microbiology Association Surabaya, Juli 12, 2008 (Co-Author).

#### **International Publication**

1. Clinical Evaluation of Conventional and Reverse Genetic Vaccines For Chicken Against H5N1-HPAI Viruses, International Symposium Of Option For The Control Of Influenza VI June 17 – June 23 2007 Toronto Ontario Canada (Co-Author).
2. C.A.Nidom, Mikiko S., Masaoki Y., Reviany V. N., Arlita L. A, Yusuf M, Amin M, Suzuki Y, Kawaoka Y., Hotta H. 2008. Detection of Avian Influenza Viruses in Stray Cats (*Felis silvestris cats*) in Indonesia By Using Serological Test and Real Time PCR. Bangkok International Conference on Avian Influenza, Bangkok, Thailand, 23-25 January 2008.
3. Yamaoka M, Nidom C.A, Reviany V.N, Yusuf MA, Hotta H, Shinya K and Kawaoka Y, 2008. Surveillance of Highly Pathogenic Avian Influenza viruses in Surabaya, 2008 Surveillance of HPAI on the chicken at Wet Market Surabaya, October 5, 2008 Hanoi Vietnam Meeting

4. M. Yusuf Alamudi, Revianny V. Nidom, Masaoki Yamaoka, Chairul. A. Nidom, Evy D.Woelandary, Teridah Ernala Ginting, Kyoko Shinya, Yukiko Muramoto, Ryo Takano, Yoshihiro Kawaoka. 2008. H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses Serosurvey on Poultry Workers In Indonesia. Asian-African Research Forum On Emerging and Re-Emerging Infection, December 15-16, 2008 Sapporo Japan
5. Revianny V. Nidom, Masaoki Yamaoka, Chairul. A. Nidom, M. Yusuf Alamudi, Teguh Mubawadi, Didik Purwanto, Teridah Ernala Ginting, Kyoko Shinya, Yukiko Muramoto, Ryo Takano and Yoshihiro Kawaoka. 2008. Surveillance of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in Indonesia. Asian-African Research Forum On Emerging and Re-Emerging Infection, December 15-16, 2008 Sapporo Japan

**BIOGRAFI / DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI**

4.1. Nama lengkap dan gelar : Revianny Vibriaanita Nidom S.Farm., Apt  
Tempat / tanggal lahir : Pasuruan, 4 Februari 1983

## 4.2. Pendidikan

UNIVERSITAS / INSTITUT DAN LOKASI	GELAR	TAHUN SELESAI	BIDANG STUDI
S1 Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya	S.Farm	2005	Farmasi
Pendidikan Profesi Apoteker Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya	Apt	2006	Farmasi
S2 Ilmu Farmasi Universitas Airlangga Surabaya	M.Farm	2009	Farmasi

## 4.3. Pengalaman kerja dalam penelitian.

INSTITUSI	JABATAN	PERIODE KERJA
Laboratorium Avian Influenza Institute Tropical Disease Universitas Airlangga Surabaya	Peneliti	2006-sekarang

## 4.4. Daftar publikasi penelitian.

**National Publication**

2. Analysis of Total RNA mice testis after receiving the water fraction of *Justicia gendarussa* Burm.f. by northern blot methode, 2005 (Author)
3. Detection of Avian Influenza Virus Subtype H5N1 with Real Time PCR and Novel Rapid Test in the Chicken, Pig and Human sample, National Seminar Of Indonesia Biochemistry and Molecular biology (PBBMI) Jakarta Desember 6, 2006 (Co-Author)
4. Analysis Phylogenetic of Haemagglutinin Avian Influenza Virus Which Infected Pig in Indonesia, National Seminar Of Indonesia Biochemistry and Molecular biology (PBBMI) Jakarta Desember 6, 2006 (Co-Author)
5. Detection Antibody to Avian Influenza Virus Subtype H5N1 on the cat sera (*Felis silvestris catus*) With Combination Serologic Test, Seminar of Indonesian Microbiology Association Banjarmasin September 1-2, 2007 (Co-Author)
6. Isolation and Characterization Avian Influenza Virus subtype H5N1 on the Wild Cat (*Felis silvestris catus*) By Novel Rapid Test and Real-Time PCR, Seminar of Indonesian Microbiology Association Banjarmasin September 1-2, 2007 (Author)

7. Comparison Antibody Titer of Chicken After Treatment With Conventional Vaccine H5N1 and Reverse Genetic of Avian Influenza H5N1, Seminar of Indonesian Microbiology Association Surabaya, Juli 12, 2008 (Co-Author)
8. Antibody Titre Of Domestic Chicken (*Gallus Domesticus*) Post Vaccination Of Avian Influenza With Homologue H5N1 Vaccine and Heterologue H5N2 Vaccine, Seminar of Indonesian Microbiology Association Surabaya, Juli, 12 2008 (Co-Author)

#### **International Publication**

1. Clinical Evaluation of Conventional and Reverse Genetic Vaccines For Chicken Against H5N1-HPAI Viruses, International Symposium Of Option For The Control Of Influenza VI June 17 – June 23 2007 Toronto Ontario Canada (Co-Author).
2. C.A.Nidom, Mikiko S., Masaoki Y., Reviany V. N., Arlita L. A, Yusuf M, Amin M, Suzuki Y, Kawaoka Y., Hotta H.2008. Detection of Avian Influenza Viruses in Stray Cats (*Felis silvestris cats*) in Indonesia By Using Serological Test and Real Time PCR. Bangkok International Conference on Avian Influenza, Bangkok, Thailand, 23-25 January 2008.
3. Yamaoka M, Nidom C.A, Reviany V.N, Yusuf MA, Hotta H, Shinya K and Kawaoka Y, 2008. Surveillance of Highly Pathogenic Avian Influenza viruses in Surabaya, 2008 Surveillance of HPAI on the chicken at Wet Market Surabaya, October 5, 2008 Hanoi Vietnam Meeting



**CURRICULUM VITAE  
(COLLABORATOR RESEARCHER)**

**NAME** : YOSHIHIRO KAWAOKA  
**DATE & PLACE OF BIRTH** : November 14, 1955; Kobe, Japan  
**CITIZENSHIP** : Japanese  
**OFFICE ADDRESS** : Department of Pathobiological Sciences  
School of Veterinary Medicine  
University of Wisconsin-Madison  
2015 Linden Drive  
Madison, WI 53706  
Tel:(608)265 4925 Fax:(608)265 5622  
[kawaokay@svm.vetmed.wisc.edu](mailto:kawaokay@svm.vetmed.wisc.edu)  
  
Division of Virology  
Department of Microbiology and  
Immunology  
Institute of Medical Science  
University of Tokyo  
4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku  
Tokyo 108-8639, Japan  
Tel:(03)5449-5504  
Fax:(03)5449-5408  
[kawaoka@ims.u-tokyo.ac.jp](mailto:kawaoka@ims.u-tokyo.ac.jp)

**ACADEMIC DEGREES:**

D.V.M.	1978	The Ministry of Agriculture and Fishery, Japan
B.S.	1978	Hokkaido University, Japan (Veterinary Medicine)
M.S.	1980	Hokkaido University, Japan (Microbiology)
Ph.D.	1983	Hokkaido University, Japan (Microbiology)

**PROFESSIONAL APPOINTMENTS:**

1980-83	Research Associate, Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Tottori University, Japan
1983-85	Postdoctoral Fellow, Department of Virology and Molecular Biology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee
1985-89	Assistant Member, Department of Virology and Molecular Biology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee
1989-95	Associate Member, Department of Virology and Molecular Biology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee

- 1991-97 Associate Professor, Department of Pathology, University of Tennessee, Memphis, Tennessee
- 1996-97 Member, Department of Virology and Molecular Biology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee
- 1997 to date Professor, Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison
- 1999 to date Professor, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Japan
- 2004 to date Visiting Professor, Creative Research Initiative, "Sousei", Hokkaido University, Japan
- 2005 to date Director, International Research Center for Infectious Diseases, Institute of Medical Science, University of Tokyo
- 2005 to date Senior Visiting Scientist, Riken.
- 2007 to date Visiting Professor, Kobe University Graduate School of Medicine

**PATENTS:**

1. Viruses Comprising Mutant Ion Channel Protein (US Patent No. 6,872,395)
2. Mutant Cells with Altered Sialic Acid (US Patent No. 7,176,021)
3. Filovirus vectors and noninfectious filovirus-based particles (US Patent No. 7,211,378)
4. Signal for packaging of influenza virus vectors (US Patent No. 7,226,774)

**RESEARCH INTEREST:**

Pathogenesis of microorganisms

**PROFESSIONAL COMMITTEES:**

- 1999 to date International Committee on Taxonomy of Viruses, Chair, *Orthomyxoviridae* Study Group
- 2002 to date Influenza Sequence Database, Advisory Board Member
- 2002 to date International Union of Microbiological Societies, Virology Division, Advisory Council Member
- 2008 to date International Union of Microbiological Societies, Virology Division, Vice Chair

**PROFESSIONAL SOCIETY MEMBERSHIPS:**

American Society for Microbiology  
 American Society for Virology  
 American Veterinary Medical Association  
 Japanese Society for Virology

Japanese Society of Veterinary Science

**PEER REVIEW COMMITTEES:**

1992 Special Review Committee, NIH (Grant reviewer)  
 07/94-06/98 Virology Study Section Member, NIH (Grant reviewer)  
 10/01 Virology Study Section Adhoc Member, NIH (Grant reviewer)

**JOURNAL EDITORIAL BOARD:**

1996 to date Journal of Virology  
 1997 to date Virus Research  
 1999-2001 American Journal of Veterinary Research  
 2001 to date Virology  
 2002 to 2006 Journal of General Virology  
 2002 to 2005 Editor, Virus Research  
 2004 to date Journal of Clinical Investigation  
 2005 to date Reviews in Medical Virology  
 2006 to date PLoS Pathogens

**AWARDS**

1991 Veterinary Science Award  
 2002 The Hideo Noguchi Memorial Award for Medicine  
 2006 Commendation for Science and Technology by the Minister of Education,  
 Culture, Sports, Science and Technology  
 2006 Robert Koch Award  
 2007 The Takeda Prize for Medical Science

**PUBLICATIONS (Last 5 years):**

**Original Articles**

240. Noda T, Ebihara H, Muramoto Y, Fujii K, Takada A, Sagara H, Kim JH, Kida H, Feldmann H, Kawaoka Y. Assembly and budding of Ebolavirus. *PLoS Pathog* 2:864-872, 2006.
241. Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Muramoto Y, Ito M, Kiso M, Horimoto T, Shinya K, Sawada T, Kiso K, Usui T, Murata T, Lin Y, Hay A, Haire LF, Stevens DJ, Russell RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ, Kawaoka Y. Hemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 444:378-382, 2006.

242. Co DO, Hogan LH, Karman J, Heninger E, Vang S, Wells K, Kawaoka Y, Sandor M. Interactions between T cells responding to concurrent mycobacterial and influenza infections. *J Immunol* 177:8456-8465, 2006.
243. Darwyn K, Jones SM, Shinya K, Kash JC, Copps J, Ebihara H, Hatta Y, Kim JH, Halfmann P, Hatta M, Feldmann F, Alimonti JB, Fernando L, Li Y, Katze MG, Feldmann H, Kawaoka Y. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* 445:23, 2007.
244. Takada A, Ebihara H, Jones S, Feldmann H, Kawaoka Y. Protective efficacy of neutralizing antibodies against Ebola virus infection. *Vaccine* 25:993-999, 2007.
245. Ozawa M, Fujii K, Muramoto Y, Yamada S, Yamayoshi S, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y. Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication. *J Virol* 81:30-41, 2007.
246. Neumann G, Geisbert TW, Ebihara H, Geisbert JB, Daddario-Dicaprio KM, Feldmann H, Kawaoka Y. Proteolytic Processing of the Ebola Virus Glycoprotein Is Not Critical for Ebola Virus Replication in Nonhuman Primates. *J Virol* 81, 2995-2998, 2007.
247. Noda T, Watanabe S, Sagara H, Kawaoka Y. Mapping of the VP40-binding regions of the Nucleoprotein of Ebola virus. *J Virol* 81, 3554-3562, 2007.
248. Garulli B, Meola M, Stillitano MG, Kawaoka Y, Castrucci MR. Efficient vagina-to-lower respiratory tract immune trafficking in a murine model of influenza A virus infection. *Virology* 361, 274-282, 2007.
249. Kurosaki Y, Takada A, Ebihara H, Grolla A, Kamo N, Feldmann H, Kawaoka Y, Yasuda J. Rapid and simple detection of Ebola virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods* 141, 78-83, 2007.
250. Sugaya N, Mitamura K, Yamazaki M, Tamura D, Ichikawa M, Kimura K, Kawakami C, Kiso M, Ito M, Hatakeyama S, Kawaoka Y. Lower clinical effectiveness of oseltamivir against influenza B contrasted with influenza A infection in children. *Clin Infect Dis* 44:197-202, 2007.
251. Hatakeyama S, Sugaya N, Ito M, Yamazaki M, Ichikawa M, Kimura K, Kiso M, Shimizu H, Kawakami C, Koike K, Mitamura K, Kawaoka Y. Emergence of Influenza B Viruses with Reduced Sensitivity to Neuraminidase Inhibitors. *JAMA* 297, 1435-1442, 2007.
252. Urata S, Noda T, Kawaoka Y, Morikawa S, Yokosawa H, Yasuda J. Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in

- the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. *J Virol* 81:4895-4899, 2007.
253. Horimoto T, Murakami S, Muramoto Y, Yamada S, Fujii K, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Kino Y, Kawaoka Y. Enhanced growth of seed viruses for H5N1 influenza vaccines. *Virology* 366:23-27, 2007.
254. Ozawa M, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y. An adenoviral vector-mediated reverse genetics system for influenza A virus generation. *J Virol* 81:9556-9559, 2007.
255. Hatta M, Hatta Y, Kim JH, Watanabe S, Shinya K, Kawaoka Y. Growth of H5N1 influenza A viruses in the upper respiratory tracts of mice *PLoS Pathog* 3:1374-1379, 2007.
256. Rigoni M, Shinya K, Toffan A, Milani A, Bettini F, Kawaoka Y, Cattoli G, Capua I. Pneumo- and eutropism of avian origin Italian highly pathogenic avian influenza H7N1 isolates in experimentally infected mice. *Virology* 364, 28-35, 2007.
257. Guo CT, Takahashi N, Yagi H, Kato K, Takahashi T, Yi SQ, Chen Y, Ito T, Otsuki K, Kida H, Kawaoka Y, Hidari KI, Miyamoto D, Suzuki T, Suzuki Y. The quail and chicken intestine have sialyl-galactose sugar chains responsible for the binding of influenza A viruses to human type receptors. *Glycobiology* 17, 713-724, 2007.
258. Sawada T, Hashimoto T, Nakano H, Suzuki T, Suzuki Y, Kawaoka Y, Ishida H, Kiso M. Influenza viral hemagglutinin complicated shape is advantageous to its binding affinity for sialosaccharide receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 355:6-9, 2007.
259. Shinya K, Watanabe S, Ito T, Kasai N, Kawaoka Y. Adaptation of an H7N7 equine influenza A virus in mice. *J Gen Virol* 88, 547-532, 2007.
260. Takada A, Ebihara H, Feldmann H, Geisbert TW, Kawaoka Y. Epitopes required for antibodydependentenhancement of Ebola virus infection. *J Infect Dis* 196 Suppl 2:S347-356, 2007.
261. Ebihara H, Theriault S, Neumann G, Alimonti JB, Geisbert JB, Hensley LE, Groseth A, Jones SM, Geisbert TW, Kawaoka Y, Feldmann H. In vitro and in vivo characterization of recombinant Ebola viruses expressing enhanced green fluorescent protein. *J Infect Dis* 196 Suppl 2:S313-322, 2007.
262. Yamayoshi S, Kawaoka Y. Mapping of a region of Ebola virus VP40 that is important in the production of virus-like particles. *J Infect Dis* 196 Suppl 2:S291-295, 2007.

263. Watanabe S, Noda T, Halfmann P, Jasenosky L, Kawaoka Y. Ebola virus (EBOV) VP24 inhibits transcription and replication of the EBOV genome. *J Infect Dis* 196 Suppl 2:S284-290, 2007.
264. Shimojima M, Ikeda Y, Kawaoka Y. The mechanism of Axl-mediated Ebola virus infection. *J Infect Dis* 196 Suppl 2:S259-263, 2007.
265. Noda T, Halfmann P, Sagara H, Kawaoka Y. Regions in Ebola virus VP24 that are important for nucleocapsid formation. *J Infect Dis* 196 Suppl 2:S247-250, 2007.
266. Murakami S, Horimoto T, Yamada S, Kakugawa S, Goto H, Kawaoka Y. Establishment of canine RNA polymerase I-driven reverse genetics for influenza A virus: its application for H5N1 vaccine production. *J Virol* 82:1605-1609, 2007.
267. Jiao P, Tian G, Li Y, Deng G, Jiang Y, Liu C, Liu W, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H. A single amino acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. *J Virol* 82:1146-1154, 2007.
268. Nochi T, Yuki Y, Matsumura A, Mejima M, Terahara K, Kim DY, Fukuyama S, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y, Kohda T, Kozaki S, Igarashi O, Kiyono H. A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses. *J Exp Med* 204:2789-2796, 2007.
269. Zhu Q, Yang H, Chen W, Cao W, Zhong G, Jiao P, Deng G, Yu K, Yang C, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H. A naturally occurring deletion in its NS gene contributes to the attenuation of an H5N1 swine influenza virus in chickens. *J Virol* 82:220-228, 2008.
270. Itoh Y, Ozaki H, Tsuchiya H, Okamoto K, Torii R, Sakoda Y, Kawaoka Y, Ogasawara K, Kida H. A vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 avian influenza virus strain confers protective immunity against highly pathogenic avian influenza virus infection in cynomolgus macaques. *Vaccine* 26:562-572, 2008.
271. Watanabe T, Watanabe S, Kim JH, Hatta M, Kawaoka Y. A novel approach to the development of effective H5N1 influenza A virus vaccines: the use of M2 cytoplasmic tail mutants. *J Virol* 82:2486-2492, 2008.
272. Halfmann P, Kim JH, Ebihara H, Noda T, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y. Generation of biologically contained *Ebolaviruses*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 1129-1133, 2008.
273. Yamayoshi S, Noda T, Ebihara H, Goto H, Morikawa Y, Lukashevich IS, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y. Ebola virus matrix VP40 protein uses the COPII transport system for its intracellular transport. *Cell Host & Microbe* 3:168-177, 2008.

274. Iwatsuki-Horimoto K, Hatta Y, Hatta M, Muramoto Y, Chen H, Kawaoka Y, Horimoto T. Limited compatibility between the RNA polymerase components of influenza virus type A and B. *Virus Res* (in press).
275. Sakabe S, Sakoda Y, Haraguchi Y, Isoda N, Soda K, Takakuwa H, Saijo K, Sawata A, Kume K, Hagiwara J, Tuchiya K, Lin Z, Sakamoto R, Imamura T, Sasaki T, Kokumai N, Kawaoka Y, Kida H. A vaccine prepared from a non-pathogenic H7N7 virus isolated from natural reservoir conferred protective immunity against the challenge with lethal dose of highly pathogenic avian influenza virus in chickens. *Vaccine* (in press).
276. Sawai T, Itoh Y, Ozaki H, Isoda N, Okamoto K, Kashima Y, Kawaoka Y, Takeuchi Y, Kida H, Ogasawara K. Induction of cytotoxic T-lymphocyte and antibody responses against highly pathogenic avian influenza virus infection in mice by inoculation of a pathogenic H5N1 influenza virus particles inactivated with formalin. *Immunology* (in press).
277. Sugaya N, Tamura D, Yamazaki M, Ichikawa M, Kawakami C, Kawaoka Y, Mitamura K. Comparison of the clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir against influenza virus infection in children. *Clin Infect Dis* 47:339-345, 2008.
278. Hao L, Sakurai A, Watanabe T, Sorensen E, Nidom CA, Newton MA, Ahlquist P, Kawaoka Y. Drosophila RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature* 454:890-893, 2008.

## Book Chapters and Review Articles

64. Neumann G, Hatta M, Kawaoka Y. Reverse genetics for the control of avian influenza. *Avian Dis* 47(3 Suppl):882-887, 2003.
65. Takada A, Kawaoka Y. Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and in vivo implications. *Rev Med Virol* 13:387-398, 2003.
66. Neumann G, Noda T, Takada A, Jasenosky LD, Kawaoka Y. Roles of filovirus matrix- and glycoproteins in the viral life cycle. In: **Ebola and Marburg Viruses: Molecular and Cellular Biology**, Feldmann and Klenk, Eds., Horizon Bioscience, Wymondham, U.K. pp 137-179, 2004.
67. Neumann G, Kawaoka Y. Reverse genetics systems for the generation of segmented negative-sense RNA viruses entirely from cloned cDNA. In: **Biology of Negative Strand RNA Viruses: The Power of Reverse Genetics**, Kawaoka ed., Springer-Verlag, Heidelberg. *Curr Top Microbiol Immunol* 283:43-60, 2004.
68. Neumann G, Brownlee G, Fodor E, Kawaoka Y., Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. In: **Biology of Negative Strand RNA Viruses:**

**The Power of Reverse Genetics**, Kawaoka ed., Springer-Verlag, Heidelberg. *Curr Top Microbiol Immunol* 283:121-143, 2004.

69. Jasenosky LD, Kawaoka Y. Filovirus budding. *Virus Res* 106:181-188, 2004.

70. Matrosovich MN, Klenk, HD, Kawaoka Y. Receptor specificity, host-range, and pathogenicity of influenza viruses. In: **Influenza Virology Current Topics**, Kawaoka ed., Horison press. p.95-137, 2005

71. Ebihara H, Groseth A, Neumann G, Kawaoka Y, Feldmann H. The role of reverse genetics systems in studying viral hemorrhagic fevers. *Thromb Haemost*, 94:240-253, 2005.

72. Parrish C, Kawaoka Y. The origins of new pandemic viruses: the acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses. *Annu. Rev. Microbiol* 59:553-86, 2005.

73. Kawaoka Y. How Ebola virus infects cells. *New Eng J Med* 352:2645-2646, 2005.

74. Horimoto T, Kawaoka Y. Influenza: Lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nature Rev Microbiol* 8:591-600, 2005.

75. Gambotto A, Barratt-Boyes SM, de Jong MD, Neumann G, Kawaoka Y. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in humans. *Lancet* 371:1464-1475, 2008.

76. Neumann G, Kawaoka Y. Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. *Emerg Infect Dis* 12:881-886, 2006.

77. Horimoto T, Kawaoka Y. Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A viruses. *Trends Mol Med* 12:506-154, 2006.

78. Neumann G, Kawaoka Y. Influenza Epidemics. In: **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES**. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. <http://www.els.net/> [doi:10.1002/9780970015902.a0002241.pub2], 2006.

79. Neumann G, Kawaoka Y. Influenza Viruses: **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES**. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. (in press).

80. Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. In: **Fields Virology**. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007. Chapter 48, pp. 1691-1740.

81. Gabriele Neumann, Kyoko Shinya, Yoshihiro Kawaoka. Molecular pathogenesis of H5N1 influenza virus infections. *Antiviral Therapy* 12:617-626, 2007.



— Original Message —

**From:** [pnas@nas.edu](mailto:pnas@nas.edu)

**To:** [niddmca@sby.centrin.net.id](mailto:niddmca@sby.centrin.net.id)

**Sent:** Monday, December 21, 2009 3:10 AM

**Subject:** Receipt of New PNAS MS#2009-12807; #2009-12808; #2009-12808

December 18, 2009

(1) Title: "**Imunogenicity and Challenge tests of Indonesian H5N1 virus vaccine on Animal Laboratory**"

Tracking #: 2009-12807

Author(s):

Muhamad Yusuf Alamudi (Airlangga University-Surabaya,Indonesia)

Reviary Vibriaanita Nidom (Airlangga University-Surabaya,Indonesia)

Chairul Anwar Nidom (Airlangga University-Surabaya,Indonesia)

Yoshihiro Kawaoka (University of Wisconsin-Madison)

(2) Title : **Surveillance of H5N1 and Pandemic H1N1 viruses in South Sulawesi as a transite región between Eastern and Western part of Indonesia.**

Tracking #: 2009-12808

Author(s):

Evi Woelandari (Department of Health, Republic of Indonesia, Jakarta)

Emma Qurnianingsih (Airlangga University –Surabaya,Indonesia)

Chairul Anwar Nidom (Airlangga University-Surabaya,Indonesia)

Yoshihiro Kawaoka (University of Wisconsin-Madison)

(3) Title : **Challenge test of Pandemic H1N1 virus vaccine to *Maccaca fascicularis***

Tracking #: 2009-12809

Author(s):

Chairul Anwar Nidom (Airlangga University-Surabaya, Indonesia)

Yoes Prijatna Dachlan (Airlangga University-Surabaya,Indonesia)

Muhamad Yusuf Alamudi (Airlangga University-Surabaya,Indonesia)

Yoshihiro Kawaoka (University of Wisconsin-Madison)

Dear Dr. Nidom,

For three manuscripts for which you participated as an author, was submitted by Dr. Kawaoka and received in our office on December 01, 2009. The manuscripts have been assigned tracking number : # 2009-12807;# 2009-12808; #2009-12809.

You may check on the status of your manuscripts at any time by clicking the link below and selecting the "Check Status" link. Please also take a moment to verify that your contact and affiliation information is accurate by clicking Manuscript Home to get to your desktop then

clicking the **Modify Profile** link to get to your profile page.

[View the manuscript](#)

PNAS License to Publish is collected for most manuscripts at initial submission. The summary below reflects our records of the PNAS License to Publish type selected by the submitting author at that time.

PNAS License to Publish Summary: PNAS License to Publish conveyed to the National Academy of Sciences. PNAS and all authors agree that this agreement will be executed electronically.

PNAS License to Publish Complete: Yes

Date PNAS License to Publish Completed: 2010-08-02

Thank you for submitting to PNAS.

Sincerely yours,

PNAS Editorial Office

(p) 202.334.2679

(f) 202.334.2739

(e) [pnas@nas.edu](mailto:pnas@nas.edu)

