

IDENTIFIKASI SUBTIPE HEMAGLUTININ VIRUS AVIAN INFLUENZA PADA BERBAGAI SPESIES UNGGAS DENGAN RT-PCR

HEMAGGLUTININ SUBTYPE IDENTIFICATION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS ISOLATED FROM VARIOUS SPECIES OF BIRD USING RT-PCR

Widya Asmara¹, Michael Haryadi Wibowo¹, Charles Rangga Tabbu²

¹Bagian Mikrobiologi FKH-UGM, ²Bagian Patologi FKH-UGM

ABSTRAK

Wabah avian influenza yang *high pathogenic* telah terjadi di beberapa wilayah di Indonesia. Infeksi virus ini menimbulkan penyakit respirasi dengan mortalitas yang tinggi pada berbagai spesies unggas, termasuk itik, ayam dan puyuh. Isolasi virus AI dari sampel itik, ayam kampung, petelur dan pedaging telah berhasil dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, menggunakan telur ayam berembrio. Subtipe hemagglutinin virus diidentifikasi dengan RT-PCR menggunakan primer spesifik H5 dan H7. Hasil penelitian memberi indikasi bahwa virus AI yang terisolasi tersebut termasuk dalam subtipe H5.

Kata kunci : avian influenza, subtype hemagglutinin, RT-PCR

ABSTRACT

Highly pathogenic avian influenza outbreaks have been reported in many parts of Indonesia. The virus infection caused severe respiratory disease and high mortality in various species of avian including ducks, chickens and quail. Virus isolation in embryonating chicken eggs was successfully carried out in the Laboratory of Microbiology Faculty of Veterinary Medicine Gadjah Mada University, from ducks, broiler, layer and kampung chickens samples. The hemagglutinin subtype were identified by means of RT-PCR using H5 and H7 specific primer. The result indicated that VAI isolates from ducks, broiler, layer and kampung chickens were belonged to H5 subtype.

Key words : avian influenza, hemagglutinin subtype, RT-PCR

PENDAHULUAN

Virus Avian Influenza (VAI) adalah virus RNA yang termasuk dalam famili Orthomyxovirus dan merupakan virus influenza tipe A. Virus influenza tipe ini dapat menginfeksi berbagai spesies unggas dan mamalia, termasuk manusia (Clavigo *et al.*, 2001; Donateli *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2000). Virus ini mempunyai amplop dengan *lipid bilayer* yang berasal dari hospes dan ditutupi dengan sekitar 500 tonjolan glikoprotein yang mempunyai aktivitas hemaglutinasi dan neuraminidase. Aktivitas ini berkaitan dengan 2 glikoprotein utama pada permukaan virus yaitu hemaglutinin (HA) dan neuraminidase (N) yang berada dalam bentuk homotrimer dan homotetramer. Analisis serologik dan genetik pada VAI dapat diketahui adanya 15 macam HA dan 9 macam N (Donateli *et al.*, 2001; Dybing *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2000; Swayne, 2004; Wharton *et al.*, 1989). Unggas air merupakan reservoir alami untuk semua subtipe VAI dan sering tidak menunjukkan adanya gejala klinis (Alexander, 2000; Tumpey *et al.*, 2002). Dalam beberapa hal VAI dapat melintas ke spesies hewan lain termasuk mamalia dan dapat menimbulkan wabah penyakit yang serius. Diantara VAI yang sering menimbulkan penyakit serius pada unggas terutama adalah yang mempunyai hemaglutinin H5, H7 dan kadang-kadang H9. Virus AI dengan H5 atau H7 dapat diklasifikasikan ke dalam 2 kelompok yaitu *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI), sedangkan VAI dengan H9 biasanya hanya bersifat LPAI. Hemaglutinin HPAIV dan LPAIV berbeda dalam kepekaannya terhadap protease hospes. Virus yang termasuk dalam kelompok HPAIV mempunyai hemaglutinin yang sangat peka terhadap protease seluler hospes, sedangkan pemotongan hemaglutinin pada LPAIV membutuhkan protease ekstra seluler aktif spesifik seperti tripsin (Alexander, 2000; Donateli *et al.*, 2001; Spackman, *et al.*, 2002; Swayne dan Suarez, 2000). Di dalam hospes yang baru VAI akan melakukan adaptasi sehingga secara evolutif dapat memunculkan strain VAI baru yang lebih virulen (Tumpey *et al.*, 2002; Swayne dan Suarez, 2003). Dari berbagai kasus AI dapat terlihat adanya variabilitas subtype dari virus penyebab wabah tersebut, seperti misalnya H7N7 di Inggris, H5N1 di Hong Kong, H5N2 dan H7N3 di Chili, H7N1 di Itali (Capua *et al.*, 2000; Swayne dan Suarez, 2003; Tumpey *et al.*, 2002).

Di Indonesia munculnya wabah AI disinyalir telah terjadi sejak akhir tahun 2003 yang merupakan bagian dari merebaknya AI di Asia Tenggara dan telah

menyebabkan kerugian yang cukup nyata. Belum efektifnya pengendalian wabah AI di Indonesia menimbulkan argumentasi apakah wabah disebabkan oleh VAI dengan subtipe H5, H7 ataukah ditimbulkan oleh strain atau varian baru. Dalam penelitian ini dilakukan identifikasi gen hemaglutinin VAI yang diisolasi dari berbagai spesies unggas dari berbagai daerah di Indonesia dengan menggunakan teknik *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Dengan diketahuinya secara pasti subtipe dari VAI akan memudahkan pengendalian wabah secara tepat.

MATERI DAN METODE

Virus AI yang digunakan dalam penelitian ini merupakan VAI koleksi Bagian Mikrobiologi FKH-UGM, yang diisolasi dari kasus AI pada itik di Jawa Timur, ayam pedaging di Jawa Tengah, ayam petelur di Lampung dan ayam kampung di Yogyakarta. Untuk keperluan isolasi genom VAI digunakan *Micro-to-Midi Total RNA Purification System* (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), sedangkan untuk amplifikasi gen hemaglutinin virus memakai *Pure Taq TM Ready to Go TM PCR beads* (Amersham Bioscience, USA). Primer spesifik untuk amplifikasi fragmen gen H5 dan H7 disusun berdasarkan *conserved region* dari H5 dan H7 yaitu 5'ACGTATGACTATCCACAATACTCAG3' dan 5'AGACCAGCTACCATGATTGC3' untuk H5 serta 5'ATTGGACACGAGACGCAATG3' dan 5'TTCTGAGTCCGCAAGATCTATTG3' untuk H7 (Spackman *et al.*, 2002).

Ekstraksi RNA genom virus dilakukan mengikuti prosedur yang disarankan oleh Invitrogen. Pada prinsipnya 0,2 ml isolat VAI dalam cairan *chorioallantois* ditambahkan kedalam 0,2 ml larutan lisis RNA yang mengandung 0,002 ml 2-mercaptoethanol. Campuran kemudian disentrifugasi pada 12.000 xg selama 2 menit suhu 25°C (*refrigerated microcentrifuge*, model 5804R, Eppendorf, Hamburg, Germany). Supernatan dipindahkan ke tabung bersih dan ditambah dengan 0,2 ml ethanol absolut. Sampel kemudian dimasukkan kedalam *RNA spin cartridge*, disentrifugasi pada 12.000 xg selama 15 menit 25°C. *Cartridge* dicuci 1x dengan 0,7 ml *wash buffer I* dan 1x dengan 0,5 *wash buffer II*. *Cartridge* kemudian dipindahkan ke *RNA recovery tube* dan RNA dielusi dengan 0,03 ml *RNAse-free water* dengan cara sentrifugasi pada 12.000 xg selama 2 menit 25°C. Konsentrasi RNA yang diperoleh diestimasi dengan *UV-Vis-Spectrophotometer* (UV-1601PC, Shimadzu,

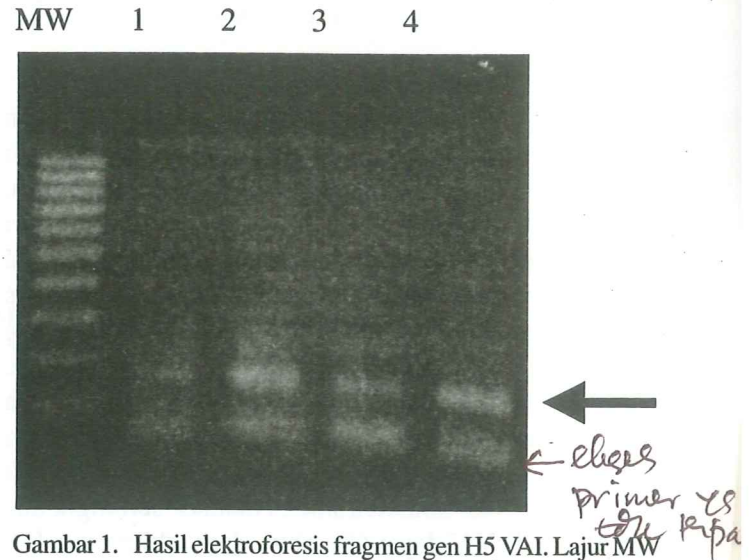
Japan). Suspensi RNA ini siap untuk *template* pada RT-PCR.

Amplifikasi fraksi gen hemaglutinin dilakukan dengan kit RT-PCR dari Amersham Bioscience. Kondisi pada tahap RT adalah 50°C selama 30 menit dan 94°C selama 15 menit. Untuk amplifikasi fragmen gen H5 kondisi PCR-nya adalah 94°C selama 30 detik, 57°C selama 30 detik dan 72°C selama 30 detik, dilakukan sebanyak 30 siklus dengan menggunakan Gene-Amp PCR System 2400 (Applied Biosystem, USA). Sedangkan untuk amplifikasi fragmen gen H7 digunakan kondisi PCR yang sama kecuali suhu anilingnya 58°C. Hasil amplifikasi dideteksi dengan **metoda elektroforesis pada gel agarose 1%**, diwarnai dengan **etidium bromida**, dan diamati dengan transluminator UV (model TMW 20, UVP Ltd, Cambridge, UK). **Pita DNA yang tampak didokumentasi dengan kamera Polaroid (model DS-300, Funakoshi, Japan).**

HASIL DAN PEMBAHASAN

Genom RNA dari keempat isolat VAI dalam penelitian ini dapat diekstraksi dengan baik. Deteksi eksistensi gen H5 dan H7 dalam genom VAI tersebut dilakukan dengan RT-PCR. Primer untuk amplifikasi fragmen gen H5 disusun berdasarkan *conserved region* yang akan mengamplifikasi antara posisi 1456 sampai dengan 1685, atau sekitar 220 bp. Demikian pula primer untuk fragmen gen H7 akan mengamplifikasi antara posisi 1244 sampai dengan 1342, atau sekitar 100 bp. Hasil RT-PCR dengan primer untuk H7 tidak menunjukkan adanya pita hasil amplifikasi untuk keempat sampel isolat VAI, sedangkan RT-PCR dengan primer untuk H5 dapat dilihat adanya pita DNA baik pada isolat VAI asal itik Jawa Timur, isolat VAI asal ayam pedaging Jawa Tengah, isolat VAI asal ayam petelur Lampung maupun isolat VAI asal ayam kampung Yogyakarta (lihat Gambar 1). Dari hasil ini dapat dikatakan bahwa keempat isolat VAI tersebut termasuk dalam subtype H5.

Ditemukannya VAI subtype H5 pada itik mungkin dapat dianggap sebagai hal yang biasa karena itik memang termasuk spesies unggas yang sering menjadi reservoir VAI tanpa adanya gejala klinis yang berarti (Alexander, 2000; Tumpey *et al.*, 2002). Akan tetapi dalam kasus ini terjadi angka kematian yang tinggi di peternakan itik yang bersangkutan dan pada bedah bangkai ditemukan adanya perubahan patognomonis untuk infeksi AI (data di Bagian Patologi FKH-UGM). Demikian pula dengan ditemukannya isolat VAI subtype



Gambar 1. Hasil elektroforesis fragmen gen H5 VAI. Lajur MW adalah penanda berat molekul (100bp leader), lajur 1 VAI asal itik Jawa Timur, lajur 2 VAI asal ayam kampung Yogyakarta, lajur 3 VAI asal ayam petelur Lampung dan lajur 4 VAI asal ayam pedaging Jawa Tengah. Tanda panah menunjuk pita hasil amplifikasi fragmen gen H5.

H5 pada ternak ayam yang diperiksa dalam penelitian ini mengindikasikan adanya wabah AI pada unggas di Indonesia yang disebabkan oleh infeksi VAI subtype H5 yang termasuk dalam kategori HPAIV. Meskipun demikian untuk memastikan apakah keempat isolat virus tersebut termasuk dalam kategori HPAIV masih perlu dilakukan pemeriksaan yang lain seperti misalnya *intravenous pathotyping* dan deteksi susunan asam amino pada *hemagglutinin cleavage site*. Pada HPAIV akan ditemukan adanya *polybasic amino acid region* (Swayne dan Suarez, 2000). Sebagai contoh misalnya AIV subtype H7 yang termasuk LPAIV mempunyai motif asam amino pada *cleavage site* -PEIPKGR*GLF- atau -PENPKGR*GLF-, sedangkan HPAIV subtype H7 pada wabah di Itali mempunyai motif -PETPKRRRR*GLF- dan -PEIPKGSRVRR*GLF-. Selain keberadaan *polybasic amino acid region*, *hemagglutinin cleavage site* juga dipengaruhi oleh glikosilasi disekitarnya. Sebagai contoh kosensus ini misalnya adalah hilangnya tapak glikosilasi pada asam amino ke 13 hemagglutinin VAI H5N2 yang menimbulkan wabah di Pennsylvania antara tahun 1983-1984. Keberadaan *polybasic amino acid region* dan posisi glikosilasi hemagglutinin dapat dipakai sebagai *pathotypic marker* VAI (Banks dan Plowright, 2003; Kawaoka *et al.*, 1984). Untuk *intravenous pathotyping* dapat dilakukan dengan menginokulasikan anak ayam umur 4-6 minggu secara intravena 0,2 ml

enceran 1:10 suspensi virus dalam cairan alantois dan diamati kematian ayam dalam 10 hari berikutnya.

Virus AI mempunyai genom berupa 8 segmen RNA untai tunggal ber-polaritas negatif dengan panjang total mencapai 14 kb dan menyandi sekitar 10 protein virus (McGeoch *et al.*, 1976). Hemaglutinin virus disandi dalam segmen 4 dan neuraminidase dalam segmen 6. Segmen-segmen yang lain menyandi protein-protein internal virus dan protein lain yang penting untuk viabilitas virus seperti misalnya segmen 8 yang menyandi NS1 yaitu suatu protein nonstructural yang berfungsi dalam *blocking host's antiviral response* (Lamb, 1989). Genom VAI yang berupa RNA untai tunggal bersegmen ini memberi peluang terjadinya pertukaran informasi genomik diantara virus influenza A dalam suatu proses yang disebut dengan *genetic reassortment*. Proses ini dapat terjadi pada gen-gen HA, N, maupun gen-gen internal yang berakibat pada meningkatnya diversitas virus, baik dalam sifat antigenic maupun virulensinya. Proses *genetic reassortment* ini pula yang diduga menyebabkan virus mampu menembus *species barrier* (Banks *et al.*, 2001; Herlocher *et al.*, 1992; Hinshaw *et al.*, 1979; Hoffmann *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1994). Selain adanya *genetic reassortment*, didalam hospes baru virus juga dapat melakukan adaptasi dan evolusi untuk menghasilkan strain baru yang lebih virulen (Tumpey *et al.*, 2002; Swayne dan Suarez, 2003). Bakat alami dari virus influenza A ini mampu melakukan *genetic drift* maupun *genetic shift* yang berakibat diantaranya dapat memunculkan strain virus baru yang secara serologik dapat berbeda dengan virus ancestralnya. Kondisi ini dapat memperumit program pengendalian wabah AI. Hasil penelitian ini baru menunjukkan eksistensi gen H5 pada keempat isolat VAI dan belum mengungkap kemungkinan adanya *genetic drift* ataupun *genetic shift* pada gen tersebut.

Primer yang dipakai dalam penelitian ini berdasarkan *conserved sequence* H5. Ketika diterapkan pada isolat VAI H5 dari Amerika akan menghasilkan pita DNA sekitar 220bp (Spackman *et al.*, 2002). Ukuran pita DNA yang diperoleh dalam penelitian ini sekitar 200bp. Dari data yang diperoleh dapat memberi indikasi adanya perbedaan antara isolat VAI subtipe H5 yang diisolasi di Indonesia dengan yang ada di Amerika. Untuk membuktikan adanya delesi maupun mutasi tipe lain pada gen H5 VAI isolat Indonesia ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, antara lain dengan analisis *single strand DNA conformation polymorphism* (SSCP) maupun identifikasi sekuen seluruh gen H yang akan mengungkap ada tidaknya perbedaan dengan strain VAI yang sekarang

dipakai sebagai strain vaksin. Informasi ini akan sangat bermanfaat dalam program pengendalian wabah AI yang lebih efektif dan efisien.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Multibreeder Adirama Indonesia atas bantuannya berupa kit untuk isolasi / ekstraksi RNA dan kit untuk RT-PCR. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada sejawat drh. NLP Indi Dharmayanti MSi atas informasi kepustakaan dan rancangan primer.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, D. J., 2000. A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 74 : 3-13.
- Bank, J., Spiedel, E., Moore, E., Plowright, L., Picirillo, A., Capua, I., Cordioli, P., Fioretti, A., and Alexander, D. J., 2001. Changes in the hemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy. *Arch. Virol.* 146 : 963-973.
- Capua, I., Mutinelli, F., Bozza, M. A., Terregino, C., and Cattoli G., 2000. Highly pathogenic avian influenza (H7N1) in ostriches (*Struthio camelus*). *Avian Pathol.* 29 : 643-646.
- Clavigo, A., Riva, J., and Copps, J., 2001. Assessment of the pathogenicity of an emu-origin influenza A H5 virus in ostriches (*Struthio camelus*). *Avian Pathol.* 30 : 83-89.
- Donateli, I., Campitelli, L., and Trani, L. 2001. Characterization of H5N2 influenza viruses from Italian poultry. *J. Gen. Virol.* 82 : 623-630.
- Dybing, J.K., Schultz-Cherry, S., Swayne, D.E., Suarez, D.L., and Perdue, M.L., 2000. Distinct pathogenesis of Hong Kong origin H5N1 viruses in mice compared to that of other highly pathogenic H5 avian influenza viruses. *J. Virol.* 74 (3) : 1443-1450.

- Herlocher, M.L., Bucher, D., and Webster, R.G., 1992. Host range determination and functional mapping of the nucleoprotein and matrix genes of influenza viruses using monoclonal antibodies. *Virus Res.* 22 : 281-293.
- Hinshaw, V.S., Webster, R.G., and Rodriguez, R.J., (1979). Influenza A viruses: combination of hemagglutinin and neuraminidase subtypes isolated from animals and other sources. *Arch. Virol.* 62 : 281-290.
- Hoffmann, E., Stech, J., Leneva, I., Krauss, S., Scholtissek, C., Chin, P.S., Peiris, M., Shortridge, K.F., and Webster, R.G., 2000. Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in Southern China: Was H6N1 a derivative or a precursor of H5N1? *J. Virol.* 74 (14) : 6309-6315.
- Kawaoka, Y., Naeve, C.W., and Webster, R.G., 1984. Is virulence of H5N2 influenza viruses in chicken associated with loss of carbohydrate from the hemagglutinin? *Virology* 139. 303-316.
- Lamb, R., 1989. Genes and protein of the influenza viruses. In *The Influenza Viruses*. Krug, R.M., (ed). Plenum Press, New York, pp. 1-67.
- Lin, Y.P., Shu, L.L., Wright, S., Bean, W.J., Sharp, G.B., Shortridge, K.F., and Webster, R.G., 1994. Analysis of the influenza virus gene pool of avian species from Southern China. *Virology*, 198 : 557-566.
- McGeoch, D., Fellner, P., and Newton, C. 1976. Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73 : 3045-3049.
- Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P. Perdue, M.L., Lohman, K., Daum, L.T., and Suarez, D.L., 2002. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3256-3260.
- Swayne, D.E., 2004. Avian influenza, vaccine and control. *Poultry Sci.* 83 : 79-81.
- Swayne, D.E., and Suarez, D.L., (2000). Highly pathogenic avian influenza. *Rev. Sci. Tech.* 19:463 - 482
- 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.E.L., Senne, D.A., Lee, J.G., Lee, Y.J., Mo, I.P., Sung, 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) : 6344-6355.
- Wharton, S.A., Weis, W., Skehel, J.J., and Wiley, D.C., 1989. Structure, Function, and Antigenicity of the Hemagglutinin of Influenza Virus. In *The Influenza Virus*. Krug, R.M., (ed), Plenum Press, New York, pp.153-174.