

Deteksi Antibodi Anti H5N1 dengan Uji Hambatan Hemagglutinasinasi dan Netralisasi

Vivi Setiawaty*, Tjahjani Mirawati Soediro**, Fera Ibrahim**, Krisna Nur AP*, Shigeyuki Itamura***, Endang R. Sedyaningsih*

* Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan, Jakarta, Indonesia

** Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

*** National Institute of Infectious Diseases, Murayama, Tokyo

ABSTRACT

Since July 2005 until May 2008, Indonesia has reported 133 confirmed cases with case fatality proportion 81%, 54% had history of direct contact with poultry (chicken). It is important to detect antibody anti H5N1 among high risk population like poultry collector house workers in DKI Jakarta. Antibody anti H5N1 were tested by. Hemagglutination Inhibition (HI) assay using A/Ck/WestJava/67/03(H5N1) and A/Ck/Banten/05-1116/05(H5N1) antigen and Neutralization (NT) assay using A/H5N1/Indo/05/IBCDC-RG virus. From 216 sera we found seropositive HI 0.5% and 14.4% with 2003 and 2005 antigen respectively, 12% by NT test. Concerning WHO recommendation that NT test is a gold standard, 12% workers had positive antibody anti H5.

Keywords: Poultry workers, H5N1. antibody, Netralisation

PENDAHULUAN

Virus avian influenza (A/H5N1) yang merupakan penyebab epidemi pada unggas pertama kali dilaporkan di Indonesia pada akhir tahun 2003. Sampai saat ini 31 dari 33 propinsi di Indonesia pernah melaporkan adanya epidemi AI pada unggas⁽¹⁾. Kasus manusia terinfeksi virus influenza A/H5N1 di Indonesia pertama kali dilaporkan dalam suatu kasus kluster keluarga pada Juli 2005, dan hingga akhir Mei 2008 telah tercatat 133 kasus konfirmasi H5N1 dengan 108 kasus kematian, 28 orang di antaranya berasal dari DKI Jakarta.⁽²⁾ Berdasarkan beberapa penelitian diketahui bahwa kontak dengan unggas sakit, baik itu berupa mengolah unggas ataupun memiliki unggas sakit menjadi faktor risiko penularan virus A/H5N1 dari unggas ke manusia.^(3,4,5) Contohnya penelitian pada pekerja peternakan di daerah dengan wabah infeksi virus avian influenza A/H5N1 pada unggas di Hong Kong pada tahun 1997-1998 memperlihatkan bahwa 10% dari para pekerjaannya mempunyai titer antibodi terhadap virus avian influenza A/H5N1 dengan pengujian mikroneutralisasi.⁽³⁾

*Dilaporkan dalam publikasi terpisah

Metode serologi untuk diagnosis infeksi virus influenza dengan cara mendeteksi antibodi meliputi *hemagglutination inhibition test* (HI), *viral neutralization test* dan ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Tes netralisasi virus adalah tes yang sangat sensitif dan spesifik untuk mengidentifikasi antibodi spesifik terhadap virus avian influenza A/H5N1 pada manusia dan hewan. Tes netralisasi dapat mendeteksi antibodi spesifik anti H5N1 pada serum manusia dengan titer rendah yang tidak dapat dideteksi oleh tes hambatan hemagglutinas (HI).⁽⁶⁾ Namun untuk melakukan tes netralisasi ini terdapat kendala yaitu harus dilakukan di laboratorium yang memiliki fasilitas BSL3, tidak dapat dilakukan di laboratorium biasa. Tes HI dapat dilakukan di laboratorium BSL 2, relatif tidak rumit dalam pengerjaannya, relatif tidak membutuhkan waktu lama untuk memperoleh hasil dan mempunyai sensitifitas yang cukup tinggi bila dibandingkan dengan uji NT sebagai *gold standard*. Tes serologis secara ELISA sampai saat ini belum dianjurkan, karena sensitifitas dan spesifisitasnya rendah.⁽⁶⁾

BAHAN DAN CARA

Serum

Penelitian ini dilakukan terhadap pekerja di 34 tempat pengumpul ayam di lima wilayah DKI Jakarta., pada bulan Maret-April 2007. Serum diperoleh dari 216 pekerja yang bersedia ikut dalam penelitian dan menandatangani surat persetujuan (*informed consent*).^{*} Serum disimpan dalam lemari pendingin -80°C sementara menunggu dilakukannya uji hambatan hemagglutinas (HI) dan netralisasi (NT). Sebelum dilakukan uji HI dan NT, kedalam serum terlebih dahulu ditambahkan *receptor destroying enzyme* (RDE) dan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 37°C selama 18 jam dan setelah itu dipindahkan ke *waterbath* suhu 56°C selama 30 menit.⁽⁷⁾

Virus dan antigen influenza A/H5N1 dan sel MDCK

Galur virus influenza A/H5N1 yang dipakai untuk uji netralisasi berasal dari virus influenza A/H5N1/Indo/05/2005/IBCDC-RG. Galur virus influenza A/H5N1/Indo/05/IBCDC-RG adalah virus hasil rekayasa genetik (*reversed genetic*, RG) oleh *Center for Disease Control* (CDC)-Atlanta, USA. Virus ini berasal dari virus influenza A/Indonesia/5/05 yang menginfeksi manusia Indonesia pertama kali pada tahun 2005.⁽⁷⁾ Virus yang digunakan diperbanyak / dibiakkan menggunakan telur ayam berembrio berusia 10 hari,^(6,10) dilakukan di laboratorium BSL3 di NIID Tokyo, Jepang. Stok virus disimpan pada lemari pendingin bersuhu -80°C.

Antigen yang dipakai untuk uji hambatan hemagglutinas berasal dari isolat virus yang menginfeksi ayam pada tahun 2003 dan 2005 yaitu galur A/Ck/West Java/67/03 (H5N1) dan A/Ck/Banten/05-1116/05 (H5N1). Antigen ini diproduksi oleh Badan Penelitian Veteriner (Balitvet) di bawah Departemen Pertanian, Bogor.

Sel yang digunakan untuk uji netralisasi adalah sel MDCK pasase ke 5 dari Laboratorium NIID, Tokyo. Sebanyak $1,5 \times 10^4$ sel/sumur dimasukkan ke plat bersumur 96 dengan dasar datar dan dikultur selama 3 hari dalam inkubator CO2 5%, 37°C. Larutan medium yang digunakan untuk biakan sel

adalah MEM (*Minimum Essential Medium*) yang telah ditambah 10% *Fetal Calf Serum* (FCS) dan 100 unit/ml Penicillin-Streptomycin. Ditentukan 50% *tissue culture infectious dose* (TCID₅₀) dengan penambahan virus yang telah diencerkan 1/2log pada sel MDCK untuk mengetahui pengenceran virus yang dibutuhkan untuk uji netralisasi.⁽¹⁰⁾

Uji netralisasi

Serum diencerkan dua kali (*2 fold dilution*) dalam plat 96 sumur datar. Virus yang telah diencerkan menjadi 100TCID₅₀/50µl ditambahkan pada serum yang telah diencerkan. Pada plat yang sama juga disertakan 4 sumur untuk kontrol virus dan 4 sumur untuk kontrol sel. Plat diinkubasi selama 30 menit pada inkubator 37°C, 5%CO₂. Sebanyak 100 µl campuran serum dan virus dipindahkan ke plat 96 sumur datar yang telah berisi sel MDCK. Plat kemudian diinkubasi selama 3 hari pada inkubator bersuhu 37°C, 5%CO₂. Pada hari ke 4, dilakukan pencucian dan inaktivasi virus serta pewarnaan sel dengan menggunakan *Naphtalene Blue Black*. Pembacaan *optical density* (OD) pada plat dilakukan dengan *plate reader* pada panjang gelombang 630 nm. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya *Cytopathic Effect* (CPE) dan nilai OD lebih kecil atau sama dengan nilai rata-rata kontrol virus. Hasil uji netralisasi dinyatakan positif bila titer antibodi anti H5N1 ≥ 80.^(3,6,11) Uji netralisasi dilakukan di laboratorium virologi, NIID Tokyo.

Uji hambatan hemagglutinasasi

Tes hambatan hemagglutinasasi dilakukan di laboratorium Virologi Badan Litbangkes terhadap antigen H5N1 tahun 2003 dan 2005 dengan menggunakan sel darah merah kuda 1%.⁽⁸⁾ Konsentrasi antigen yang dipakai untuk uji HI adalah 8HAU/50µl (4HAU/25µl).⁽⁷⁾ Hasil uji HI dinyatakan positif bila titer antibodi anti virus influenza A/H5N1 menunjukkan ≥ 40.^(12,13)

Analisis homologi nukleotida dan asam amino gen HA-H5N1

Analisis data homologi dilakukan dengan perangkat lunak *Genetyx MFC Application version 5.1.1.0*. Analisis sekuens berdasarkan data koleksi *gene bank* yang diperoleh dari *NCBI, Database, Influenza virus resources*. Sekuens virus influenza A/H5N1 (avian) dipilih berdasarkan kesesuaian wilayah asal virus dengan asal ayam di tempat pengumpul ayam yang diteliti, yaitu dari Jawa Tengah dan/atau Jawa Barat. Sedangkan sekuens virus influenza A/H5N1 (manusia) dipilih sesuai dengan asal virus yang digunakan untuk uji NT, yaitu virus influenza A/H5N1 diisolasi dari manusia Indonesia pada tahun 2005 yang berasal dari provinsi Banten dan virus influenza A/H5N1 diisolasi pada tahun 2007 dari pasien yang berasal dari provinsi Banten, yang sudah terdapat di bank data. Galur virus yang dilakukan analisis homologi adalah A/Indonesia/5/05, A/Indonesia/6/05, A/Indonesia/CDC1046/07, A/Indonesia/CDC1047/07, A/chicken/Indonesia/17/03, A/chicken/Indonesia/11/03, A/chicken/Purworejo/BBVW/05, A/Chicken/Indonesia/Wates130/05, A/chicken/Magelang1631-57/07 dan A/Chicken/Indonesia/Semerang1631-62/07.

Sekuens nukleotida dan asam amino dari setiap galur virus dibandingkan berdasarkan pertimbangan jenis antigen yang dipakai untuk HI yaitu H5N1/ayam/2003 dan H5N1/ayam/2005 dan virus influenza A/H5N1/2005 (human) yang digunakan untuk uji NT serta pertimbangan bahwa serum pekerja yang diuji diambil pada tahun 2007.

Hasil

Uji HI dengan antigen A/Ck/WestJava/67/03 (H5N1) dan antigen A/Ck/Banten/05-1116/05 (H5N1) (Balitvet), memberikan hasil titer yang berkisar antara 10-320 (secara keseluruhan dapat dilihat pada tabel 1). Berdasarkan penelitian yang telah ada, titer antibodi anti influenza A/H5N1 yang dianggap positif terinfeksi virus influenza A/H5N1 dengan uji HI adalah 40 atau lebih.^(12,13) Dari 216 serum pekerja yang dites terdapat 31 (14.4 %) serum yang mempunyai titer 40 atau lebih dengan uji HI menggunakan antigen A/Ck/Banten/05-1116/05 (H5N1)-Balitvet, sedangkan uji HI dengan antigen A/Ck/WestJava/67/03 (H5N1)-Balitvet mendeteksi 1 (0.5%) serum yang mempunyai titer lebih besar atau sama dengan 40. Hasil uji HI menggunakan antigen A/Ck/Banten/05-1116/05 memberikan hasil positif lebih banyak dari uji HI menggunakan antigen A/Ck/West Java/67/03 (H5N1)-Balitvet.

Tabel 1. Hasil uji HI dengan antigen A/Ck/West Java/67/03 (H5N1)-Balitvet dan A/Ck/Banten/05-1116/05 (H5N1)-Balitvet.

No.	Titer Antibodi	Hasil HI (Ag 2003)	Hasil HI (Ag 2005)
		(N=216) Jumlah (%)	(N=216) Jumlah (%)
1.	< 10	207 (95.8%)	163 (75.5%)
2.	10	3 (1.4%)	10 (4.6%)
3.	20	5 (2.3%)	12 (5.6%)
4.	40	-	16 (7.4%)
5.	80	1 (0.5%)	13 (6%)
6.	160	-	1 (0.5%)
7.	320	-	1 (0.5%)
Total serum yang mempunyai titer \geq 40		1 (0,5%)	31 (14,4%)

Pada uji netralisasi, kriteria positif yang digunakan adalah lebih besar atau sama dengan 80, berdasarkan kriteria WHO dan penelitian yang dilakukan oleh Thomas Rowe pada tahun 1999.^(6,11) Dari 216 serum yang diperiksa dengan uji netralisasi, antibodi anti virus influenza A/H5N1 dinyatakan positif pada 26 serum (12%). Hasil uji netralisasi menggunakan virus rekayasa genetik telah dibandingkan dengan uji netralisasi menggunakan virus galur A/Indonesia/5/05 yang bukan rekayasa genetik dan memberi hasil yang sama. Hasil pemeriksaan seluruh sampel dengan uji NT dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji Netralisasi dengan virus influenza A/H5N1/Indo/05/IBCCD-RG.

No.	Titer antibodi dengan uji NT	Jumlah serum (N=216)
1.	< 10	127 (58.8%)
2.	10	22 (10.2%)
3.	20	20 (9.3%)
4.	40	21 (9.7%)
5.	80	17 (7.9%)
6.	160	7 (3.2%)
7.	320	2 (0.9%)
Total serum yang mempunyai titer \geq 80		26 (12%)

Perbandingan hasil positif uji HI menggunakan antigen 2005 dengan hasil uji NT dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Perbandingan hasil uji HI (A/Ck/Banten/05-1116/05) dengan hasil uji NT

	NT positif (\geq 80)	NT negatif (<80)	Total
HI positif (\geq 40)	24	7	31
HI negatif (< 40)	2	183	185
Total	26	190	216

Hasil uji HI memperlihatkan bahwa sensitifitas uji HI dengan antigen tahun 2005 adalah 92.3% dengan interval kepercayaan 95% adalah 76,84 – 98,69 dan spesifisitas uji HI adalah 96.3% dengan interval kepercayaan 95% adalah 92,85 – 98,38. Kesesuaian hasil uji NT dengan uji HI memakai antigen 2005 dari 216 serum, secara statistik bermakna dengan $p = 0,000$ (uji Kappa). Hasil uji Kappa juga memperlihatkan nilai realibilitas uji HI (Ag 05) dengan uji NT sebesar 81,8%.

Hasil analisis homologi strain virus influenza A/H5N1 ayam dan manusia yang berasal dari tahun yang berbeda dapat dilihat pada tabel 4. Analisis homologi nukleotida virus influenza A/H5N1 berkisar 95.9 – 100% dan asam amino berkisar 96,5 – 99,6%.

Tabel 4. Hasil analisis homologi nukleotida dan asam amino dari gen HA strain virus influenza A/H5N1 ayam 2003, 2005, 2007 dan manusia 2005, 2007.

Nukleotida Asam Amino	A/Indo/5/05	A/Indo/7/05	A/Indo/CD C1046/07	A/Indo/CD C1047/07	A/ck/Indo/7/03	A/ck/Indo/1/03	A/ck/Purworejo/BBVW/05	A/ck/Indo/Wates130/05	A/ck/Indo/Magelang1631-57/07	A/ck/Indo/Semarang1631-62/07
A/Indo/5/05		98.9	98.5	98.6	98	98.3	98.4	98.8	97.2	99.3
A/Indo/7/05	99,6		97.8	97.8	98	97.7	98	98.4	96.7	98.3
Indo/1046/07	98.6	98,2		99,7	96.6	96.9	97	97.3	95.9	98.3
Indo/1047/07	98.7	98,4	99.8		96.7	97.1	97.2	97.5	96	98.3
Ck/Indo/7/03	98	98	96.9	96.7		99.3	98.4	97.9	97.3	97.4
Ck/Indo11/03	98.4	98.4	97	97,1	99.6		98.5	98.2	97.6	97.6
Ck/Purworejo/05	98.5	98.2	97.2	97,3	98.4	98.7		98.4	97.4	97.8
Ck/wates/05	98.9	98.5	97.7	97.7	98.3	98.6	98.7		97	98.2
Ck/Mglg57/07	98.2	97,8	96.7	96.9	97.5	97.9	98	97.3		96.6
Ck/Smrg62/07	99.6	99,3	98.6	98.7	97.7	98	98,2	98.4	97.8	

Hasil perbandingan analisis epitope imunogenisitas spesifik asam amino HA-H5 pada posisi asam amino 151 – 160^(14,15) memperlihatkan adanya perubahan A 156 T pada strain virus dari ayam dan manusia yang diisolasi tahun 2005 dan 2007 (A/ck/Purworejo/BBVW/2005, A/ck/wates130/2005, A/ck/Magelang1631-57/2007, A/ck/Semarang1631-62/2007, A/Indonesia/CDC1046/2007, A/Indonesia5/2005, A/Indonesia7/2005) bila dibandingkan dengan virus dari ayam tahun 2003 (A/ck/Indonesia/11/2003 dan A/ck/Indonesia/7/2003).(tabel 5)

Tabel 5. *Alignment* sekuens asam amino HA pada posisi 151 – 160 dari protein HA H5 dari Virus influenza A/H5N1 ayam tahun 2003, 2005, 2007 dan manusia tahun 2005, 2007.

151' I K K N S T Y P T I 160'	A/HK/156/97 ^(13,14)
- - - - -	- - - - -
A/ck/Purworejo/BBVW/2005(H5N1)	A/ck/Wates130/2005(H5N1)
- - - - -	A/ck/Indonesia/11/2003(H5N1)
- - - - - A - - - - -	A/ck/Indonesia/7/2003(H5N1)
- - - - - A - - - - -	
- - - - -	
A/Indonesia/CDC1046/2007(H5N1)	A/Indonesia5/2005 (H5N1)
- - - - -	A/Indonesia7/2005 (H5N1)
- - - - -	A/ck/Magelang1631-
57/2007(H5N1)	
- - - - -	A/ck/Semerang1631-
62/2007(H5N1)	

Analisis homologi asam amino gen HA virus A/Indonesia/5/05 dengan virus influenza A/H3N2 galur A/Thailand/CU124/2006 dan A/H1N1 galur A/Thailand/CU32/2006 telah dilakukan dan memberikan hasil sekuens asam amino yang sangat berbeda.

DISKUSI

Pada penelitian ini jumlah serum yang positif pada uji HI dengan antigen ayam tahun 2005 lebih besar dari pada hasil HI positif pada penelitian yang dilakukan oleh Trang, NV, et.al pada tahun 2007. Penelitian Trang, N.V, et.al dilakukan pada pekerja peternakan ayam di 3 provinsi di Vietnam, yang pada tahun 2006 pernah melaporkan adanya kasus infeksi virus avian influenza A/H5N1 pada manusia. Penelitian yang dilakukan oleh Trang, et.al di Vietnam ini menguji antibodi anti virus avian influenza A/H5N1 dengan uji HI menggunakan antigen A/Ck/Vietnam/6/03 (H5N1) dan dikonfirmasi dengan uji mikroneutralisasi (MN) menggunakan virus NIBRG-14 (virus influenza H5N1 A/Vietnam/1203/04). Hasilnya sebanyak 4,7% pekerja peternakan mempunyai titer positif dengan uji HI.⁽¹⁶⁾ Semua pekerja mempunyai riwayat kontak dekat dengan unggas.

Jumlah uji HI yang memberikan nilai positif lebih tinggi di Indonesia daripada di Vietnam ini diperkirakan karena perbedaan subyek dalam penelitian. Pada penelitian ini, serum berasal dari pekerja di tempat pengumpul ayam di mana para pekerja kontak langsung dengan ayam yang berbeda setiap hari, sehingga faktor risiko yang dihadapi lebih besar dibandingkan risiko yang dihadapi oleh para pekerja peternakan.

Penggunaan antigen dari tahun yang berbeda untuk uji HI pada penelitian ini dilakukan dengan pertimbangan bahwa virus influenza A mempunyai sifat yang selalu melakukan evolusi / perubahan, terutama Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA) yang terdapat di permukaan virus, sehingga tidak dikenali lagi oleh respon imun pejamu.^(19,20) Kemungkinan adanya evolusi pada virus avian influenza A/H5N1 yang menyerang unggas di Indonesia tahun 2003 dengan virus avian influenza A/H5N1 yang menyerang unggas di Indonesia tahun 2005 sangat besar.⁽²¹⁾

Posisi asam amino epitope gen HA virus influenza A/H5N1 manusia maupun ayam tahun 2005 dan 2007 berbeda dengan virus influenza A/H5N1 ayam tahun 2003. Namun posisi asam amino epitope gen HA dari virus influenza A/H5N1 manusia maupun ayam tahun 2007 di Indonesia belum berubah bila dibandingkan dengan tahun 2005. Perubahan posisi asam amino epitope gen HA terjadi pada T 156 A. Antigen yang berasal dari tahun 2005 (A/Ck/Banten/05-1116/05) yang diisolasi dari ayam pada tahun 2005 masih dapat mendeteksi antibodi pada serum pekerja tempat pengumpul ayam yang diambil pada tahun 2007, namun antigen yang berasal dari tahun 2003 tidak dapat.

Uji NT merupakan *gold standard* untuk menentukan adanya antibodi anti H5N1 pada serum manusia. Uji NT ini mempunyai beberapa kelemahan yaitu memerlukan biaya yang tinggi karena menggunakan sel MDCK dan harus dilakukan di laboratorium BSL-3 jika menggunakan virus influenza A/H5N1 yang patogen, memerlukan waktu yang lebih lama untuk memperoleh hasil (4 hari) karena menunggu sampai terjadi CPE pada sel MDCK serta memerlukan ketrampilan khusus.⁽²²⁾ Virus influenza A/H5N1/Indo/05/IBCDC-RG digunakan untuk uji netralisasi dengan pertimbangan bahwa virus ini diisolasi pada tahun yang sama dengan antigen virus yang digunakan untuk uji HI. Hasil uji NT menunjukkan sebanyak 26 (12%) serum mempunyai antibodi anti H5N1 yang dapat menetralkan virus influenza A/H5N1.

Uji HI dan NT menunjukkan kesesuaian hasil yang bermakna, walaupun dua serum yang menunjukkan nilai positif dengan uji NT memperlihatkan hasil negatif dengan uji HI. Hal ini mungkin disebabkan rendahnya respon antibodi yang diinduksi oleh virus avian influenza (H5N1), sehingga tidak dapat terdeteksi oleh uji HI. Uji netralisasi lebih dapat mendeteksi adanya antibodi anti H5 karena hasil uji dibaca dengan amplifikasi virus yang dibaca dengan adanya CPE pada sel MDCK.⁽²³⁾ Uji HI tetap dapat digunakan untuk mendeteksi adanya respon imun pejamu terhadap virus influenza, sebab uji HI mempunyai sensitifitas yang cukup tinggi yaitu 92.3% dengan uji NT sebagai baku emas. Uji HI dapat digunakan oleh banyak laboratorium karena menggunakan teknik yang sederhana, tidak membutuhkan waktu lama (1 hari) dan relatif tidak memerlukan biaya yang tinggi, dapat dilakukan di laboratorium BSL 2. Uji HI selain digunakan untuk mendeteksi respon antibodi terhadap infeksi virus influenza A manusia juga digunakan untuk menentukan karakteristik antigenik berbagai galur virus influenza A manusia.⁽²³⁾

Adanya antibodi anti virus avian influenza A/H5N1 menunjukkan bahwa telah terjadi infeksi atau paparan virus avian influenza A/H5N1 pada para pekerja tempat pengumpul ayam, meskipun mereka tidak merasakan

adanya gejala sakit berat. Hal tersebut mungkin karena para pekerja ini terpapar secara sedikit demi sedikit dengan virus influenza A/H5N1 yang patogenisitasnya rendah, sehingga paparan ini mampu menstimulasi timbulnya antibodi anti H5N1 tetapi tidak cukup untuk menimbulkan gejala secara klinis.^(3,23)

Analisis homologi asam amino dilakukan pada virus influenza A/H5N1 Indonesia, baik yang menyerang ayam maupun manusia dari berbagai tahun, dikarenakan pada penelitian ini digunakan berbagai jenis antigen yang berasal dari virus influenza A/H5N1 yang berbeda tahun untuk uji HI dan NT, yang memberikan hasil yang berbeda. Homologi asam amino antara virus influenza A/Indonesia/5/2005 (H5N1) dengan virus influenza A yang berasal dari ayam tahun 2007, A/chicken/Magelang1631-57/2007(H5N1) adalah 98,2%. Sedangkan homologi sekuens asam amino virus influenza A/Indonesia/5/2005 (H5N1) dengan virus influenza A/Indonesia/CDC1046/2007(H5N1) adalah 98.6%. Hasil analisis homologi ini menunjukkan bahwa virus influenza A/H5N1/Indo/05/IBCDC-RG mempunyai kekerabatan yang dekat dengan virus influenza A/H5N1 pada ayam dan manusia yang diisolasi pada tahun 2007. Hal ini berarti, antibodi anti H5 pada serum pekerja tempat pengumpul ayam yang diambil pada tahun 2007 dan terinfeksi oleh virus influenza A dari ayam tahun 2007 maupun dari ayam pada tahun 2005 masih dapat dideteksi dengan uji NT menggunakan virus A/H5N1/Indo/05/IBCDC-RG.

Homologi asam amino antara virus influenza A/chicken/Indonesia/7/2003(H5N1) dan A/ck/Purworejo/BBVW/2005(H5N1) dengan A/Indonesia/CDC1046/2007(H5N1) berturut-turut adalah 96.6% dan 97%. Dari sini terlihat perbedaan sekuens asam amino antara virus influenza A/chicken/Purworejo/BBVW/2005(H5N1) dengan A/Indonesia/CDC1046/2007(H5N1) adalah 3%, sedangkan perbedaan sekuens asam amino antara virus influenza A/chicken/Indonesia/7/2003(H5N1) dengan A/Indonesia/CDC1046/2007(H5N1) adalah 3.4%. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa kekerabatan antara virus influenza A/H5N1 yang diisolasi dari ayam pada tahun 2005 dengan virus influenza A/H5N1 yang diisolasi dari manusia pada tahun 2007 lebih dekat dibandingkan dengan virus influenza A/H5N1 yang diisolasi dari ayam tahun 2003. Hasil homologi ini mungkin dapat menjelaskan bahwa hasil uji HI dengan antigen yang berasal dari ayam yang diisolasi pada tahun 2005 yang diperkirakan mempunyai sekuens yang sama dengan sekuens virus A/ck/Purworejo/BBVW/2005(H5N1) (perbedaan kekerabatan 0,4%) lebih sesuai dengan antibodi anti H5N1 pada serum sampel yang diuji sehingga dapat mendeteksi adanya antibodi tersebut.

Imunogenisitas spesifik asam amino HA-H5 terletak pada posisi 36, 83, 86, 120, 140, 155, 156, 162, 183, 189, 212, 223 dan 263.^(14,15) Hanya posisi asam amino 156 yang memperlihatkan perbedaan antara virus tahun 2003 dengan virus tahun 2005 dan 2007. Virus influenza A (ayam) pada tahun 2003 mempunyai asam amino Alanin (A) di posisi 156, sedangkan Asam amino virus influenza A manusia maupun ayam tahun 2005 dan 2007 mempunyai Threonin (T) pada posisi 156. Adanya perbedaan asam amino pada posisi 156 ini mempengaruhi hasil uji HI. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh E. Hoffman et. al., perubahan asam amino T → A pada posisi 156 dapat menyebabkan titer HI yang rendah.⁽¹⁵⁾ Perubahan

asam amino pada posisi 156 tersebut menjelaskan mengapa uji HI yang menggunakan antigen yang berasal dari virus influenza A/H5N1 dari ayam tahun 2005 memberikan lebih banyak hasil positif (lebih reaktif) daripada menggunakan antigen virus influenza A/H5N1 dari ayam tahun 2003. Uji HI mendeteksi adanya antibodi anti H5, tetapi tidak terdeteksi dengan uji netralisasi.

Kemungkinan adanya reaksi silang antibodi anti H5 dengan antibodi anti H1 dan H3 sangat kecil karena sekuens asam amino gen HA H5 sangat berbeda dengan gen HA H1 dan H3. Hal ini juga dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan oleh E.A. Govorkova, et. al., dimana vaksinasi dengan virus influenza A/HK/213/03-RG (H5N1) pada ferret yang sudah mempunyai titer antibodi anti H3 dan tidak berpengaruh terhadap timbulnya antibodi anti H5 karena protein HA H3 dan H5 yang berbeda.⁽²⁴⁾

KESIMPULAN

Sebanyak 12% pekerja tempat pengumpul ayam di DKI Jakarta dideteksi mempunyai antibodi anti virus influenza A/H5 dengan uji HI memakai antigen A/ck/Banten/05-1116/05 (H5N1) serta dengan uji NT memakai virus influenza A/Indo/05/H5N1/IBCDC-RG. Pemeriksaan antibodi anti virus influenza A/H5 dengan uji HI memperlihatkan hasil yang berbeda antara penggunaan antigen virus yang berasal dari tahun 2003 dibandingkan dengan tahun 2005, karena adanya perbedaan epitop yang mempengaruhi uji HI. Karena itu antigen yang digunakan sebaiknya berasal dari tahun yang sama dengan tahun serum diambil untuk pemeriksaan antibodi anti virus influenza A/H5 dengan uji HI. Selain itu perlu dilakukan pemeriksaan uji HI dengan menggunakan antigen yang berasal dari wilayah geografis yang sama dengan asal unggas yang ada di TPnA.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Mirna Robert - Du Ry van Beest Holle, MD MPH EPIET, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), The Netherland dan Japan International Cooperation Agency (JICA) untuk dukungan financial. Kami juga mengucapkan terima kasih kepada Dr. Ruben Donis, PhD, Center for Disease Control, Atlanta, GA untuk virus dan Badan Penelitian Veteriner, Departemen Pertanian – RI untuk penyediaan antigen.

DAFTAR PUSTAKA

1. Departemen Pertanian, Direktorat Jenderal Peternakan. (2006) Epidemiologi flu burung pada unggas di Indonesia.
2. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Pusat Komunikasi Publik, Sekretariat Jenderal Departemen Kesehatan. Satu lagi pasien flu burung. Diunduh dari <http://www.depkes.go.id/index.php>. Diakses tanggal 28 Mei 2008.
3. Bridges, C.B., W. Lim, J.H. Primmer, L. Sims, K. Fukuda, K.H. Mak, et.al. (2002) Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry workers, Hong Kong, 1997-1998. *Journal of Infectious Diseases*.185:1005-10.
4. Sedyaningsih, E.R., S. Isfandari, V. Setiawaty, L. Rif'ati, S. Harun, W. Purba, et.al. (2007) Epidemiology of cases of H5N1 virus infection in Indonesia, July 2005 – June 2006. *Journal of Infectious Diseases*:196.
5. Dinh, P.N., Hoang T.L., Nguyen Thi K.T., Nguyen T.H., Le Thi Q.M., Le H.P., et.al. (2006) Risk factor for human infection with avian influenza A H5N1, Vietnam, 2004. *Emerging infectious diseases*. 12(12):1841-47.
6. Rowe, T., R.A. Abernathy, J. Hu-Primmer, W.W. Thompson, X. Lu, W. Lim, et al. (1999) Detection of antibody to Avian Influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serological assays. *Journal of Clinical Microbiology* 37(4):937-43.
7. World Health Organization Global Influenza Programme. (2002) WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Diunduh dari http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_NCS_2002_5/en/print.html. Diakses tanggal 30 September 2007.
8. Stephenson, I., J.M. Wood, K.G. Nicholson, M.C. Zambon, 2003. Sialic Acid Receptor specificity on erythrocytes affects detection of antibody to avian influenza haemagglutinin. *J. Med. Virology*. 70: 391-8.
9. Summary from CDC-Indo 05RG. (2006) Center for Disease Control, Atlanta, Georgia. *Unpublished*.
10. Protokol pemeriksaan uji Netralisasi dari NIID Jepang. (2006) *Unpublished*.
11. WHO case definitions for human infections with influenza A(H5N1) virus, 26 August 2006. Diunduh dari . Diakses tanggal 30 September 2007.
12. Katz, J.M., X. Lu, A.M. Frace, T. Morken, S.R. Zaki, T.M. Tumpey. (2000) Pathogenesis and immunity to avian influenza A H5 viruses. *Biomed and Pharmacother*. 54:178-87.
13. Wood, J.M. (2001) Development vaccines againts pandemic influenza. *The Royal Society*.356:1953-60.
14. Class, E.C.J., A.D.M.E Osterhaus, R. van Beek, J.C. De Jong, G.F. Rimmelzwaan, D.A Senne, et. al. (1998) Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *The Lancet*. 351:472-7.

15. Hoffmann, E., A.S. Lipatov, R.J. Webby, E.A. Govorkova, R.G. Webster. (2005) Role of specific hemagglutinin amino acids in the immunogenicity and protection of H5N1 influenza virus vaccines. *Proceeding of National Academy of Sciences*. 102(36): 12915-20.
16. Trang, N.V., N.H. Binh, T.T. Sao Mai, D.T. Van, B.N. Anh, N.N. Tuan, et. al. (2007) Detection of anti H5 antibodies in sera of H5N1 contact in Vietnam. Poster presentation in Avian Influenza Conference, Bangkok.
17. Ortiz, J.R., M.A. Katz, M.N. Mahmoud, S. Ahmed, S.I. Bawa, E.C. Farnon, et.al. (2007) Lack of evidence of avian-to-human transmission of avian influenza A (H5N1) virus among poultry workers, Kano, Nigeria, 2006. *Journal of Infectious Diseases*.196:1685-91.
18. Ortiz, E.J., T.J. Kochel, A.W. Capuano, S.F. Satterquist, G.C. Gray. (2007) Avian influenza and poultry workers, Peru, 2006. *Influenza Other Respir Viruses*.1(2):65-9.
19. Sinya, K., M. Hatta, S. Yamada, A. Takada, et al. (2005) Characterization of human H5N1 influenza A virus isolated in 2003. *Journal of Virology*: 9926-32.
20. Stevens, J., O. Blixt, T.M. Tumpey, J.K. Taubenberger, J.C. Paulson, I.A. Wilson. (2006) Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 312:404-10.
21. Webster, R.G. and E.A. Govorkova. (2006) H5N1 influenza – continuing evolution and spread. *New Engl. Journal of Medicine*. 355(21):2174-7.
22. Hierholzer, J.C. and R.A. Killington. (1996) Virus isolation and quantitation, In: B.W.J. Mahy and H.O. Kangro, editors. *Virology Methods Manual*, Academic Press:25-46.
23. Subbarao, K. and J. Katz. (2000) Avian influenza viruses infecting humans (review). *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 57:1770-84.
24. Govorkova, E.A., R.J. Webby, J. Humberd, J.P. Seiler, R.G. Webster. (2006) Immunization with reverse-genetics-produced H5N1 influenza vaccine protects Ferrets against homologous and heterologous challenge. *Journal of Infectious Disease*.194:159-167.