

2

**KEWASPADAAAN PENULARAN VIRUS AVIAN INFLUENZA (H5N1)
DARI UNGGAS KE MANUSIA
(Berdasarkan Analisis Perlekatan Reseptor)**

**TRANSMISSION AWARENESS OF AVIAN INFLUENZA VIRUS (H5N1) FROM
POULTRY TO HUMAN
(Based on Receptor Binding Site Analysis)**

Triwibowo Ambar Gardjito¹⁾ Siwi Pramutama Mars Wijayanti²⁾

Staf Loka Litbang Depkes P2B2 Donggala¹⁾ Staf Pengajar Jurusan Kesehatan Masyarakat
FKIK Unsoed²⁾

ABSTRACT

The first outbreak of bird flu noted that 18 person in Hongkong 1997 were infected by avian influenza subtype H5N1, and 6 of whom died. A novel capability of this highly pathogenic virus to infect human made a big concern. The genetic evolution of its receptor binding site was predicted to happen in this virus. Molecular changes such as amino acid mutations in important positions of receptor binding site was believed will affect receptor binding preference. This research was conducted to analyze important positions of receptor binding site of avian influenza virus H5N1 in chicken isolate from Purworejo to find out whether there was significant mutations that lead to change receptor binding preference. Chronological steps of methods were constructed in this research consists of RNA isolation, amplification of receptor binding site using specific primers by one step Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), electrophoresis and sequencing process with automated sequencer. Software of Clustal X and Genedoc were used in alignment and mutation analysis. Based on analysis with alignment in important positions of receptor binding site, we concluded that there was no significant mutations that predicted will change receptor binding preference. Sample from Purworejo still show classic constellation of avian-like receptor Glu226 and Gly228. So, at simple point of view we can assume that this sample still had receptor binding preference to SA α 2,3Gal (avian receptor), but a new finding of research that indicated there were SA α 2,3Gal receptor in lower respiratory tract of human must be concerned.

Keywords : Receptor binding site, avian influenza, H5N1, hemagglutinin

PENDAHULUAN

Kejadian luar biasa terinfeksi manusia oleh virus avian influenza (H5N1) pada kasus di Hongkong tahun 1997 yang menyebabkan 18 orang terinfeksi dan 6 di antaranya meninggal menunjukkan bahwa virus yang berpatogenesis tinggi ini telah mampu melintasi barier yang spesifik host (Horimoto dan Kawaoka, 2001). Hospes alami virus ini sebenarnya adalah unggas air liar, namun kemampuannya untuk bisa menginfeksi manusia

diperkirakan karena telah terjadi perubahan genetik pada virus ini. Kasus pertama flu burung pada manusia tersebut terus bertambah, menginfeksi berbagai negara, dan terjadi beberapa kasus kluster keluarga yang menunjukkan telah terjadinya penularan antar manusia yang terbatas. Menurut laporan WHO sampai data terakhir 24 September 2009, kasus flu burung pada manusia di Indonesia mencapai 141 kasus dan 115 di antaranya meninggal dunia (WHO, 2009).

Kekhawatiran utama yang muncul adalah virus ini terus berkembang sehingga cepat terjadi perubahan antigenisitas yang mengacu pada peningkatan kemampuan untuk dapat menginfeksi host manusia secara efektif dan terjadi perubahan spesifitas reseptor yang meningkatkan potensi epidemiologis virus untuk mengakibatkan terjadinya pandemik (Lipatov, 2004). Virus avian influenza (AI) H5N1 telah memenuhi dua kriteria untuk memicu terjadinya pandemik yaitu kemampuan untuk bereplikasi pada manusia dan menimbulkan penyakit dan tidak adanya antibodi terhadap virus ini pada sebagian besar populasi manusia, sedangkan kriteria ketiga yang sejauh ini belum terdeteksi yakni efektifnya penyebaran antar manusia (Claas *et al.*, 1998). Munculnya kasus kluster keluarga yang terjadi di Hongkong, Thailand (Ungchusak *et al.*, 2005), Indonesia (Kandun *et al.*, 2006), dan Turki menunjukkan bahwa dunia sudah berada pada periode waspada pandemik (fase keempat). Satu-satunya faktor mengapa virus ini belum menimbulkan pandemik adalah karena masih minimalnya transmisi yang terjadi antar manusia (Poland, 2006).

Pembatasan rentang host virus avian influenza salah satu ditentukan oleh tapak perlekatan reseptornya (*Receptor Binding Site/RBS*) yang sangat spesifik, hal ini menyebabkan virus tidak mudah untuk dapat menginfeksi host lain yang tidak cocok dengan reseptornya. Virus influenza pada manusia cenderung berinteraksi dengan *N-Acetylsialic acid* yang terikat pada galaktosa dengan ikatan $\alpha 2,6(\text{NeuAc}\alpha 2,6\text{Gal})$,

sedangkan virus avian dan *equine* berikatan dengan N-Acetylsialic acid yang terikat pada galaktosa dengan ikatan $\alpha 2,3$ (NeuAc $\alpha 2,3$ Gal)(Glaser *et al.*, 2005; Gambaryan *et al.*, 2005). Perubahan kecenderungan perlekatan reseptor dari reseptor avian (SA $\alpha 2,3$ Gal) ke reseptor manusia (SA $\alpha 2,6$ Gal) akan menyebabkan transmisi antar manusia semakin efektif. Mutasi asam amino tunggal pada posisi penting di *receptor binding site* dapat merubah kecenderungan perlekatan reseptor (Glaser *et al.*, 2005). Posisi asam amino 138, 190, 194, 194, 225, 226 dan 228 relatif konstan pada RBS avian, sedangkan pada manusia kadang memperlihatkan adanya substitusi pada posisi tersebut (Matrosovich *et al.*, 2004). Berbagai referensi menunjukkan bukti beberapa posisi lain yang mempengaruhi perlekatan reseptor seperti tambahan posisi yaitu 98, 136, 153, 183, 193, 222 dan 227 (Stevens *et al.*, 2006), posisi 186 dan 196 (Yamada *et al.*, 2006) dan 133 dan 138 (Auewarakul *et al.*, 2007). Posisi 226 dan 228 tercatat sebagai posisi yang paling krusial, yakni adanya Gln226 dan Gly228 khas terdapat pada reseptor avian, dan Leu226 dan Ser228 khas terdapat pada reseptor manusia. Terjadinya mutasi pada posisi ini akan mendukung perubahan spesifitas reseptor hospes (Gambaryan *et al.*, 2006).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah ada mutasi di posisi-posisi penting tapak perlekatan reseptor sampel virus yang diteliti yakni isolat ayam kampung asal Purworejo untuk menentukan kecenderungan penularan virus tersebut yakni masih cenderung pada unggas atau sudah pada manusia.

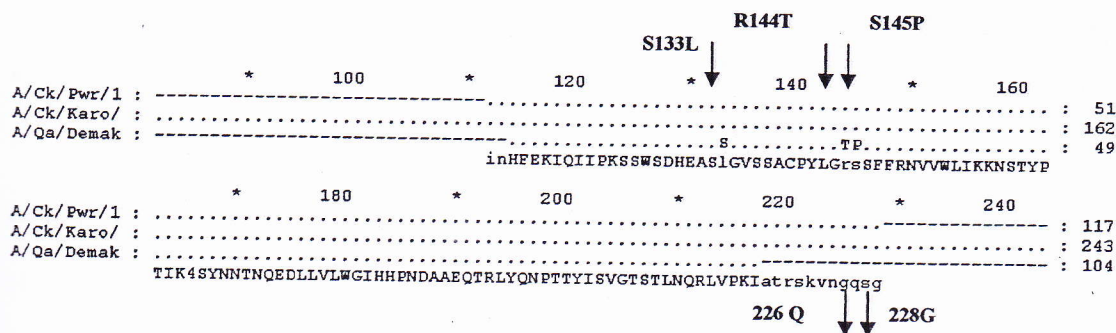
METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini merupakan penelitian deskriptif observasional yang dilakukan di Laboratorium Avian Influenza, Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Penelitian menggunakan isolat dari ayam kampung asal Purworejo (swab kloaka) (A/Ck/Purworejo/17-KA/2005) yang terinfeksi virus H5N1, diisolasi pada tahun 2005. Tahap penelitian ini terdiri dari isolasi RNA sampel, amplifikasi

sampel menggunakan primer spesifik dengan metode RT-PCR, mengkonfirmasi hasil amplifikasi dengan elektroforesis serta tahap akhir yaitu sekuensing yang dilakukan dengan sekunser otomatis di BPPT. Pada RT-PCR, primer spesifik yang digunakan adalah primer *forward* (CR1) : 5'-TCC ACT TTG CCC GTT TAC TTT GGA-3' (dengan konsentrasi 43,7 n mol) dan primer *reverse* (Oligo 1) 5'-AAT AAA CCA TTT TGA GAA AAT TCA-3' (dengan konsentrasi 92,52 pmol/μl). RT-PCR dilakukan dengan menggunakan kit SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum^R Taq DNA Polymerase (Invitrogen) selama 40 siklus dengan *melting temperatur* (T_m) : 50 °C. Hasil RT-PCR kemudian dikirim di BPPT, Tangerang untuk disekuensing, namun sebelumnya sampel telah dipurifikasi terlebih dahulu. Analisis data dilakukan dengan menerjemahkan hasil sekuen nukleotida dengan program GeneDoc 2.6.002, kemudian membandingkan kedua sampel yang diteliti dengan referensi sekuen virus H5N1 lain yang ada di *genebank* dengan program Clustal X (1.81), baik dengan referensi asal unggas maupun mamalia.

HASIL

Hasil sekuensing isolat yang diteliti (A/Ck/Pwr/17-KA/2005) mampu terbaca sebanyak 351 nukleotida (urutan nukleotida 334-684) dan diterjemahkan menjadi 117 asam amino (posisi asam amino 112-228). Ada atau tidaknya mutasi pada urutan asam amino yang berhasil diterjemahkan tersebut dilakukan dengan mensejarkannya dengan referensi sekuen lain. Hasilnya terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Urutan Asam Amino Isolat Sampel Ayam Kampung Asal Purworejo (A/Ck/Purworejo/17-KA/2005) dibandingkan dengan Sekuen Burung Puyuh Asal Demak dan Sekuen Ayam Asal Karo. Sekuen sampel terdapat pada baris kedua.

Pengamatan asam amino pada posisi penting RBS pada sampel dilakukan dengan melakukan *alignment*/pensejajaran dengan 25 referensi sekuen virus AI H5N1 asal mamalia yang telah ada pada bank gen (*genebank*). Sekuen referensi yang diambil juga termasuk kasus flu burung pertama di Indonesia serta kasus kluster terbesar kasus flu burung di Karo (Tabel 1).

Tabel 1. Perbandingan Susunan Asam Amino pada Posisi-posisi Penting *Receptor Binding Site* A/Ck/Purworejo/17-KA/2005 dengan Referensi Sekuen dari Virus yang Diisolasi dari Mamalia (Merujuk pada Tabel Stevens *et al.*, 2006).

Strain Virus	Posisi Asam Amino												
	136	153	183	190	193	194	216	221	222	225	226	227	228
A/Viet/1203/04	S	W	H	E	K	L	R	S	K	G	Q	S	G
A/Thai/5(KK-494)/04	S	W	H	E	K	L	R	S	K	G	Q	S	G
A/Hanoi/30408/05	S	W	H	E	K	L	R	S	K	G	Q	S	G
A/Cambodia/JP52a/05	S	W	H	E	K	L	R	S	K	G	Q	S	G
A/Thai/676/05	S	W	H	E	K	L	R	S	K	G	Q	S	G
A/HK/212/03	S	W	H	E	R	L	K	S	K	G	Q	N	G
A/HK/156/97	S	W	H	E	K	L	E	P	K	G	Q	S	G
A/Swine/Fujian/1/03	S	W	H	E	K	L	K	S	K	G	Q	S	G
A/Guangxi/1/05	S	W	H	E	K	L	K	S	K	G	Q	S	G
A/Anhui/2/05	S	W	H	E	K	L	K	S	K	G	R	S	G
A/H/Iraq/207/06	S	W	H	E	R	L	K	S	K	G	Q	S	G
A/Turkey/12/06	S	W	H	E	R	L	K	S	K	G	Q	N	G
A/Egypt/2947- /06	S	W	H	E	R	L	K	S	K	G	Q	N	G
A/Azerbaijan/011-162/06	S	W	H	E	R	L	K	S	K	G	Q	S	G
A/Qa/Demak/Mgy/2005	S	W	H	E	R	L	K	-	-	-	-	-	-
A/Ck/Pwr/17-KA/2005	S	W	H	E	R	L	K	S	K	G	Q	S	G
A/Ina/CDC329/06	S	W	H	E	R	L	K	S	K	G	R	S	G
A/feline/Ina/CDC1/06	S	W	H	E	R	L	K	S	K	G	Q	S	G
A/Ina/CDC357/06	S	W	H	E	R	L	K	S	K	G	Q	S	G
A/Ina/5/05	S	W	H	E	R	L	K	S	K	G	Q	S	G
A/Ina/CDC1031/07	S	W	H	E	R	L	K	S	K	G	Q	S	G
A/Ina/CDC887/06	S	W	H	E	R	L	K	S	K	G	Q	S	G
A/Ina/CDC1046/07	S	W	H	E	R	L	K	S	K	G	Q	S	G
A/Ina/CDC1047/07	S	W	H	E	R	L	K	S	K	G	Q	S	G
A/Ina/CDC1032N/07	S	W	H	E	R	L	K	S	K	G	Q	S	G
A/Ina/CDC7/05	S	W	H	E	R	L	K	S	K	G	Q	S	G
A/Ina/CDC625L/06	S	W	H	E	R	L	K	S	K	G	Q	S	G

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil urutan asam amino yang berhasil diterjemahkan, dapat dilihat bahwa posisi krusial RBS sampel yang diteliti masih menunjukkan pola yang identik dengan referensi yang lain. Sampel A/Ck/Purworejo/17-KA/2005 masih menunjukkan adanya Glutamin pada posisi 226 (Gln226) dan Glisin pada posisi 228 (Gly228), pola ini khas pada reseptor avian yang mendukung spesifitas reseptor ke SA α 2,3Gal sehingga diperkirakan kecenderungan penularan virus avian influenza saat ini masih ke unggas.

Karakteristik lain yang dapat dicermati pada sekuen sampel yang diteliti adalah mutasi S133L. Mutasi ini menarik karena perubahan pada posisi ini diperkirakan dapat berakibat pada perlekatan reseptor karena Ser133 membentuk kontak atomik dengan reseptor sialosida seluler (WHO, 2005). Implikasi terjadinya mutasi S133L sejauh pengetahuan penulis memang belum ada yang menjelaskannya, hanya mutasi L133V yang ditemukan pada isolat virus AI H5N1 dari pasien terinfeksi flu burung H5N1 di Thailand yang menunjukkan perubahan kecenderungan perlekatan reseptor dari SA α 2,3Gal menjadi mampu berikatan dengan SA α 2,3Gal dan SA α 2,6Gal (Auewarakul *et al.*, 2007).

Beberapa hal yang menarik tampak pada Tabel 1, berupa mutasi yang terjadi pada beberapa referensi sekuen yang masuk dalam *alignment*. Adanya mutasi pada posisi 226, 227 pada beberapa strain virus harus dicermati lebih lanjut. Adanya mutasi S227N yang terjadi di Hongkong, Mesir dan Turki dihubungkan dengan terjadinya kasus kluster keluarga. Beberapa mutasi yang terjadi pada daerah tapak perlekatan reseptor telah membedakan virus AI H5N1 yang beredar dewasa ini dengan virus H5N1 yang diisolasi pada tahun 1997 (Gambaryan *et al.*, 2006). Mutasi pada posisi krusial 226 dimana Q226R (Glutamin menjadi Arginin) teramati pada sekuen asal Indonesia (A/Ina/CDC329/06), sekuen ini merupakan hasil isolasi dari korban meninggal kasus kluster flu burung di

Kampung Cipedung, Indramayu. Kasus kluster flu burung ini menyebabkan 1 orang meninggal di antara 4 anggota keluarga yang terinfeksi virus ini.

Munculnya tapak glikosilasi baru yang terjadi pada kebanyakan strain virus H5N1 tahun 2004-2005 juga terjadi pada sekuen sampel. Mutasi Alanin menjadi Threonin pada posisi 160 (A160T) biasanya dihubungkan dengan adaptasi virus dan peningkatan virulensi pada unggas darat (WHO, 2005). Selain itu, adanya seleksi pada posisi ini dapat menyebabkan munculnya strain avian virus dengan afinitas yang lebih tinggi terhadap jaringan epitelium pernafasan manusia (Gambaryan *et al.*, 2005). Penelitian baru mengemukakan bahwa terdapat SA α 2,3 Gal yang ditemukan pada sel-sel yang tidak bersilia pada saluran pernafasan manusia yakni sel *bronchiolar cuboidal* pada persimpangan antara *respiratory bronchiole* dan alveolus manusia pada saluran pernafasan bagian bawah (Shinya *et al.*, 2006). Sel lain yang juga mengekspresikan SA α 2,3 Gal pada saluran pernafasan bawah manusia yakni pneumosit tipe II dan makrofag alveolar (Van Riel *et al.*, 2006). Penemuan tersebut menjelaskan mengapa virus avian influenza dapat menginfeksi manusia tanpa mengubah spesifitas perlekatan reseptornya. Fakta ini juga mengindikasikan bahwa paparan langsung sel-sel epitelial trakhea manusia dengan virus AI H5N1 dalam konsentrasi tinggi dapat memediasi infeksi langsung virus avian influenza ke manusia melalui reseptor SA α 2,3Gal pada trakhea.

KESIMPULAN

Berdasarkan analisis pada posisi penting *receptor binding site* sampel yang diteliti, tidak terjadi mutasi penting yang diperkirakan akan mempengaruhi perlekatan reseptor sehingga kecenderungan perlekatan reseptor sampel diperkirakan masih ke reseptor avian (SA α 2,3Gal). Namun kewaspadaan proporsional harus tetap dilakukan karena ternyata ada sebagian kecil sel-sel pernafasan manusia bagian bawah yang mempunyai reseptor SA α 2,3Gal yang memungkinkan virus avian influenza H5N1 ini menginfeksi manusia.

SARAN

1. Perlu penelitian lanjutan berupa uji spesifitas reseptor untuk mengetahui kecenderungan perlekatan reseptor virus H5N1 sampel yang diteliti, lebih cenderung ke SA α 2,3Gal atau SA α 2,6Gal, sehingga dapat diambil kesimpulan yang lebih mendalam.
2. Diperlukan penelitian yang menggabungkan bidang epidemiologi, klinis dan biologi molekuler untuk mengungkap fenomena terjadinya kluster kasus avian influenza pada manusia di Indonesia, untuk mengamati apakah ada hubungan genetik seseorang dengan tingkat kepekaannya terhadap perlekatan reseptor virus H5N1.

DAFTAR PUSTAKA

- Auewarakul, P., Suptawiwat, O., Kongchanagul, A., Sangma, C., Suzuki, Y., Ungchusak, K., Luisirirotchanakul, S., Lerdsamran, H., Pooruk, P., Thitithanyanont, A., Pittayawonganon, C., Guo, C. T., Hiramatsu, H., Jampangern, W., Chunsutthiwat, S and Puthavathana, P. 2007 . An Avian Influenza H5N1 Virus that Binds to Human Type Receptor. *J Virol* ; 07:1-24.
- Claas, E. C. J., Osterhaus, A. D. M. E., Beek, R. V., DeJong, J. C., Rimmelzwaan, Senne, D. A., Krauss, S., Shortridge, K. F and Webster, R. G. 1998. Human Influenza A H5N1 Virus Related to a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus. *The Lancet* 351: 472-476.
- Gambaryan, A., Yamnikova, S., Lvov, D., Tuzikov, A., Chinarev, A., Pazynina, G., Webster, R., Matrosovich, M and Bovin, N. 2005. Receptor Specificity of Influenza Viruses from Birds and Mammals : New Data on Involvement of Inner Fragment of the Carbohydrate Chain. *Virology* 334: 276-283.
- Gambaryan, A., Tuzikov, A., Pazynina, G., Bovin, N., Balish, A and Klimov, A. Evolution of the Receptor Binding Phenotype of Influenza A (H5) Viruses. 2006. *Virology* 2006; 344: 432-438.
- Glaser, L., Stevens, J., Zamarin, D., Wilson, I. A., Garcia-Sastre, A., Tumpey, T. M., Basler, C. F., Taubenberger, J. K and Palese, P. 2005 A Single Amino Acid Substitution in 1918 Influenza Virus Hemagglutinin Changes Receptor Binding Specificity. *J Virol* ;79 (17):11533-11536.
- Horimoto T and Kawaoka Y. 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *Clin Microbiol Rev* 14: 129-149.
- Kandun, I. N., Wibisono, H., Sedyaningsih, E.R., Yushman., Hadisoedarsuno, W., Purba, W., Santoso, H., Septiawati, C., Tresnaningsih, E., Heriyanto, B., Yuwono, D., Harun, S., Soeroso, S., Giriputra, S., Blair, P. J., Jeremijenko, A., Kosasih, H., Putnam, S.D., Samaan, G., Silitonga, M., Chan, K. H., Poon, L.L.M., Lim, W., Klimov, A., Lindstrom, S., Guan, Y., Donis, R., Katz, J., Cox, N., Peiris, M and Uyeki, T. M. 2006. Three Indonesian Clusters of H5N1 Virus Infection in 2005. *N Engl J Med* 355;2186-2194.

- ✓
- Lipatov, A. S., Govorkova, E. A., Webby, R. J., Ozakik, H., Peiris, M., Guan, Y., Poon, L and Webster, R. G. 2004. Minireview : Influenza : Emergence and Control. *J Virol* 78 (17): 8951-8959.
- Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A and Klenk, H. D. 2004. Human and Avian Influenza Viruses Target Different Cell Types in Cultures of Human Airway Epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*;101(13): 4620-4624.
- Poland, G.A. 2006. Editorials: Vaccines Against Avian Influenza—A Race Against Time. *N Engl J Med* 354 (13): 1411-1413.
- Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N and Kawaoka, Y. 2006. Influenza Virus Receptor in the Human Airway. *Nature* 440:435-436.
- Stevens, J., Blixt, O., Tumpey, T. M., Taubenberger, J. K., Paulson, J. C and Wilson, I. A. 2006. Structure and Receptor Specificity of the Hemagglutinin from an H5N1 Influenza Virus. *Science*; 312:404-410.
- Ungchusak, K., Auewarakul, P., Dowell, S.F., Kitpati R., Auwanit, W., Puthavathana, P., Uiprasertkul, M., Boonak, K., Pittayawonganon, C., Cox, N.J., Zaki, S.R., Thawatsupha, P., Chittaganpitch, M., Konthong, R., Simmerman, J and Chunsutthiwat, S. 2005. Probable Person to Person Transmission of Avian Influenza A (H5N1). *N Engl J Med* 352 (4):333-340.
- Van Riel, D., Munster, V. J., de Wit, E., Rimmelzwaan, Fouchier, R. A. M., Osterhaus, A. D.M.E., and Kuiken, T. 2006. H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract. *Science* 312:399.
- World Health Organization. 2005. Evolution of H5N1 Avian Influenza Viruses in Asia. The World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. *Emerg Infect Dis*;11(10):1515-1521.
- World Health Organization, 2009. *Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO*. www.who.int/csr/disease/avian-influenza/country/cases_table:2009_09_24/en/index.html.
- Yamada, S., Suzuki, Y., Suzuki, T., Le, M. Q., Nidom, C. A., Tagawa, Y. S., Muramoto, Y., Ito, M., Kiso, M., Horimoto, T., Shinya, K., Sawada, T., Kiso, M., Usui, T., Murata, T., Lin, Y., Hay, A., Haire, L. F., Stevens, D. J., Russell, R. J., Gamblin, S. J., Skehel, J. J., and Kawaoka, Y. 2006. Haemagglutinin Mutations Responsible for the Binding of H5N1 Influenza A Viruses to Human-type Receptors. *Nature*; 444:278-382.