

## KONFIRMASI AVIAN PARAMYXOVIRUS TIPE 1 (APMV-1) SECARA HISTOPATOLOGIS, SEROLOGIS, DAN MOLEKULER

### *Confirmation of Avian Paramyxovirus Tipe 1 (APMV-1) Infection by Histopathology, Serology, and Molecular Method*

I Gusti Agung Arta Putra<sup>1\*</sup> dan Anak Agung Ayu Mirah Adi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Anatomi dan Fisiologi Fakultas Peternakan Universitas Udayana, Denpasar

<sup>2</sup>Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar

\*Corresponding author: artaputra@unud.ac.id; artaputra@gmail.com

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mendeteksi infeksi *avian paramyxovirus* tipe 1 (APMV-1) melalui pemeriksaan lesi mikroskopis ayam yang dicurigai menderita *Newcastle disease* (ND) dan mengonfirmasi agen penyebab secara serologis dan molekuler. Sampel diperoleh dari peternakan skala rumah tangga dan komersial dari sembilan kabupaten dan kota di Provinsi Bali. Sampel yang diduga ND diuji terlebih dahulu dengan uji cepat untuk mendeteksi antigen virus *avian influenza* (AI). Sampel yang negatif AI kemudian dinekropsi, organ otak, paru-paru dan usus diambil untuk pemeriksaan histopatologis. Sampel jaringan otak, paru-paru, limpa dan usus diambil secara aseptik untuk isolasi dan memperbanyak virus. Cairan alantois terinfeksi dikumpulkan dan diuji dengan uji *hemagglutination assay* (HA) dan *hemagglutination inhibition* (HI) untuk membuktikan APMV-1 secara serologis. Untuk membuktikan APMV-1 secara molekuler, asam ribonukleat virus ditranskripsi balik menjadi *complementary deoxyribonucleic acid* (cDNA) kemudian dilakukan reaksi *polymerase chain reaction* (PCR). Perubahan yang ditemukan pada otak adalah *perivascular cuffing* (20%), *endoteliosis* (75%), dan *gliosis* (75%). Perubahan yang ditemukan pada paru-paru adalah *pneumonia interstitialis* (50%), *pneumonia lobaris* (5%), dan proliferasi pneumosit tipe 2 (100%). Pada usus, lesi mikroskopis yang ditemukan adalah enteritis kataralis (75%) dan enteritis nekrotik dan hemoragi (10%). Konfirmasi serologis dan molekuler dari 20 isolat yang diperoleh dalam penelitian ini adalah positif APMV-1. Sebanyak 80% dari *amplicon* menunjukkan pita tunggal pada PCR dan 20% masih optimasi untuk mendapatkan pita DNA yang tunggal.

Kata kunci: *amplicon*, APMV-1, molekuler, serologi

#### ABSTRACT

Research was conducted to detect APMV-1 infection by examining microscopic lesions of chicken suspected ND and confirming the causative agent with serological and molecular assay. Samples obtained from commercial and back yard farm in 9 regencies and city of Bali Province were tested by rapid test for AIV antigen detection. AI negative samples were necropsied, then brain, lungs, and intestines were collected for histopathological examination. Samples tissue of brain, lung, spleen, and intestine were taken aseptically for viral isolation and amplification. Infected allantoic fluid was collected and tested by hemagglutination assay (HA) and hemagglutination inhibition (HI) test to prove APMV-1 serologically. Viral ribonucleic acid was isolated and subsequently reverse transcribed by reverse transcription reaction followed by amplification by polymerase chain reaction to multiply the cDNA. Microscopically, *perivascular cuffing* (20%), *endoteliosis* (75%), and *gliosis* (75%) were found in the brain. In the lung, an *interstitialis pneumonia* (50%), *lobar pneumonia* (5%), and *proliferation of pneumosit type 2* (100%) were observed. The most prominent intestinal lesions were *catarrhal enteritis* (75%) and *hemorrhagic necrotizing enteritis* (10%). Confirmation of the 20 isolates obtained in this study both serologically and molecularly were positive APMV-1. Moreover PCR results showed that 80% of its *amplicon* showed a single band and 20% still require some optimizations to get single good bands.

Key words: *amplicon*, APMV-1, molecular, serologic

#### PENDAHULUAN

Infeksi virus *avian paramyxovirus* tipe 1 (APMV-1) dapat mengakibatkan penyakit *Newcastle disease* (ND) yang berdampak ekonomi sangat luas. Penyakit ini dapat menyebar dengan cepat, menembus batas negara, menyebabkan konsekuensi sosio-ekonomis, dan implikasi perdagangan global, sehingga dimasukkan ke dalam daftar A dari *Office International des Epizootica* (OIE, 2009). Pada unggas yang rentan, infeksi virus ND yang sangat ganas (*velogenic*) dapat menyebabkan kematian sampai 100% (Alexander, 2003). Selain itu, secara klinis penyakit ini sangat mirip dengan infeksi virus *avian influenza* (AI) sangat ganas (*highly pathogenic avian influenza/HPAI*) (Wang *et al.*, 2008) dan infeksi campuran ND dan AI yang sering ditemukan pada sekelompok ternak unggas.

Mengingat APMV-1 merupakan virus yang sangat luas keragaman genetiknya serta variasi patogenisitasnya (Czegledi *et al.*, 2002), satu-satunya upaya untuk

mencegah penyakit ini pada ayam adalah melakukan vaksinasi dengan vaksin yang tinggi tingkat homologinya secara genetik dan antigenik dengan virus yang beredar di lapangan saat ini. Upaya pencegahan berupa vaksinasi merupakan tindakan utama dalam pencegahan penyakit ND, yang tingkat keberhasilannya sangat tergantung pada tingkat homologi gen dan situs antigenik antara virus vaksin dan virus yang beredar di lapangan. Dengan demikian, idealnya secara berkala diadakan evaluasi genetik terhadap virus yang beredar di lapangan. Dengan mengetahui karakteristik molekuler virus yang beredar di lapangan maka wabah dapat diantisipasi dengan pembuatan *seed* virus vaksin yang mempunyai tingkat homologi genetik dan antigenik yang mendekati sempurna.

Jika dipandang dari sudut kesehatan hewan virus ini sangat merugikan sehingga perlu diberantas, namun di sisi lain, ternyata virus APMV-1 ini mempunyai sifat onkolisis yang dapat dieksploitasi menjadi agen antikanker pada manusia (Kinoh *et al.*, 2004; Adi dan

Astawa, 2006). Oleh karena itu, pustaka *deoxyribonucleic acid* (DNA) yang merupakan salah satu luaran dari penelitian ini akan bermanfaat untuk penelitian lebih lanjut di bidang *chimeric virus production, pathogenetic assays*, dan eksplorasi potensi sebagai agen onkolisis sebab APMV-1 dinyatakan memiliki potensi yang bagus untuk *virotherapy* kanker (Schirrmacher, 2005; Springfield *et al.*, 2006).

## MATERI DAN METODE

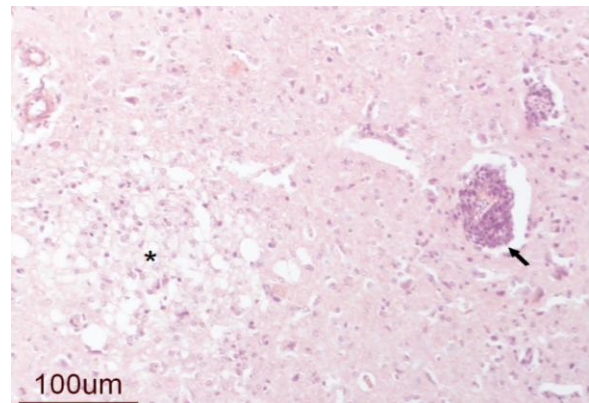
Penelitian ini menggunakan sampel ayam sakit/mati yang diduga disebabkan oleh infeksi APMV-1. Sampel berupa ayam sakit atau mati diambil dari peternakan skala rumah tangga maupun peternakan komersial di Bali. Mengingat penyakit AI endemis di Bali sehingga kejadian infeksi ganda antara penyakit ND dengan AI sering ditemukan di lapangan, maka hanya sampel yang negatif AI dengan *AIV antigen detection kit* yang digunakan sebagai obyek penelitian. Ayam dinekropsi dan selanjutnya organ otak, paru-paru dan usus diambil dan dimasukkan ke dalam *neutral buffer formaline* (NBF) untuk pembuatan preparat histopatologis, sedangkan untuk isolasi dan propagasi virus, organ ayam yang diambil adalah otak, paru-paru, limpa, usus. Organ diambil secara aseptis dihancurkan dengan menggunakan mortar steril kemudian inokulum yang didapat diinokulasikan pada telur ayam berembrio (TAB). Setelah embrio mati, cairan alantois dikoleksi serta diuji untuk mengonfirmasi keberadaan virus APMV-1 dengan *hemagglutination assay* (HA) diikuti dengan uji *hemagglutination inhibition* (HI) sesuai prosedur standar.

Asam inti *ribonucleic acid* (RNA) virus ND diekstrak dari cairan alantois, dengan metode Trizol, dengan perbandingan 250 µl cairan alantois ditambah 750 µl Trizol. Setelah divorteks selama beberapa saat, campuran dibiarkan pada suhu kamar selama 5 menit. Ke dalam campuran kemudian ditambahkan 200 µl kloroform, setelah divorteks, didiamkan selama 15 menit. Kemudian campuran disentrifuga selama 15 menit pada 14.000 rpm dan bagian supernatannya diambil. Cairan supernatan selanjutnya ditambahkan 500 µl isoprofil alkohol dan kembali didiamkan selama 10 menit. Campuran kembali disentrifuga dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit dan supernatannya dibuang. Pelet kemudian dicuci dengan 1.000 µl alkohol 70%, dan disentrifuga dengan kecepatan 7.500 rpm. Supernatan dibuang, RNA dikeringkan dan disuspensikan dalam akuades yang bebas dari enzim RNase (*diethyl pyro carbonat treated water*). Reaksi transkripsi balik yakni RNA virus ND diubah menjadi *complementary DNA* (cDNA) menggunakan enzim *reverse transcriptase* dan campuran lima jenis primer depan (*sense primer*) (Adi *et al.*, 2008). Ke dalam tabung mikro ditambahkan 4 µl *reverse transcription* (RT) *buffer*; 2 µl dNTP 10 mM; 0,25 µl RNase inhibitor (Toyobo); 10 µl akuades; 0,25 µl *reverse transcriptase* (Rever Treace Toyobo); 2,5 µl primer (lima jenis primer depan masing-masing 0,5 µl); dan 1 µl sampel RNA sebagai *template*. Campuran ini

kemudian diinkubasikan pada suhu 30° C selama 10 menit, pada suhu 40° C selama 60 menit dan pada suhu 100° C selama 5 menit. Kemudian secepatnya didinginkan dengan cara dimasukkan dalam boks berisi es. Sampel cDNA yang didapat dalam reaksi ini selanjutnya diamplifikasi dengan reaksi *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan sepasang primer F10s (5'-gcagctgcaggaattgtgtg-3), yang posisinya pada lokus 4555-4574 dan F10r (5'-tctttgagcaggaggatgttg-3') yang posisinya pada lokus 4990-5010 pada urutan basa genom lengkap dari NDV/LaSota (NCBI No. AF77761) (Adi, 2011).

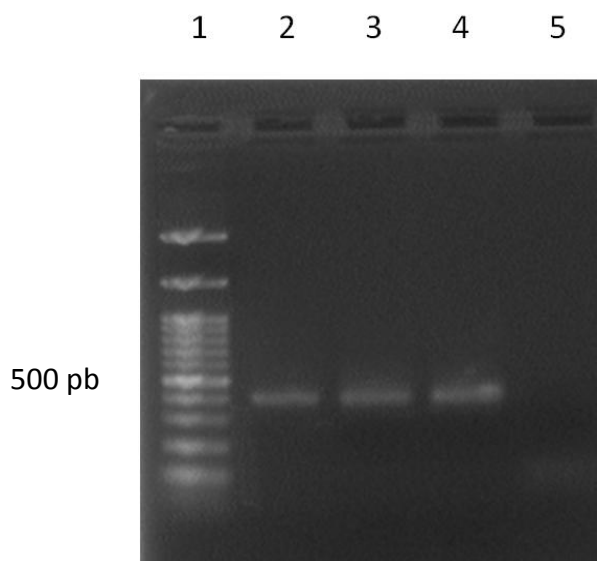
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari 20 kasus ayam sakit/mati yang diduga penyakit ND yang dijadikan sampel dalam penelitian ini (Tabel 1), virus APMV-1 berhasil diisolasi dan dipropagasi pada TAB, yang titer HA-nya sangat bervariasi (Tabel 1). Untuk sampel yang titer HA-nya masih di bawah 2<sup>3</sup> dipropagasi ulang pada TAB sampai didapatkan titer  $\geq 2^3$ . Gambaran mikroskopis yang menonjol ditemukan pada otak adalah *gliosis, endotheliosis, dan vasculitis* sampai dengan *perivascular cuffing* (PVC). Pada sampel ayam dengan gejala tortikollis parah (sampel dengan kode B4/AK/2014) selain ditemukan lesi pada pembuluh darah berupa *endotheliosis, vasculitis* dan PVC, juga ditemukan lesi berupa pembentukan vakuola dari neuropil serebrum (Gambar 1). Walaupun secara klinis ayam tidak menunjukkan gejala saraf namun dalam pengamatan mikroskopis sudah ditemukan lesi pada otak terutama pada daerah korteks serebri (Tabel 2).



**Gambar 1.** Histopatologis dari serebrum sampel dengan kode B4/AK/2014. Lesi yang menonjol adalah *perivascular cuffing* (tanda panah) dan pembentukan vakuola dari neuropil (tanda bintang). Pewarnaan HE

Pada organ paru-paru, ditemukan lesi berupa pneumonia dengan derajat keparahan yang bervariasi. Lesi pada paru-paru berupa proliferasi sel pneumosit tipe 2 dengan derajat yang bervariasi selalu ditemukan walaupun ayam sampel tidak menunjukkan gejala klinis berupa gangguan pernafasan. Lesi berupa enteritis hanya ditemukan pada ayam yang menunjukkan gejala diare. Pada ayam yang menunjukkan gejala diare berdarah ditemukan perubahan berupa enteritis ulseratif di daerah mukosa duodenum (Tabel 2).



**Gambar 2.** Hasil amplifikasi cDNA isolat Gianyar dan Klungkung dengan primer spesifik APMV-1. 1= Marker 100 pb, 2= Isolasi G1/AK/2014; 3= Isolasi G2/AK/2014; 4= Isolasi K1/AB/2014. 5= Kontrol negatif

Hasil isolasi RNA yang dilanjutkan dengan reaksi transkripsi balik untuk membuat cDNA sudah berhasil dilakukan, dan DNA sudah diamplifikasi dengan reaksi PCR, *amplicon* dengan ukuran yang diharapkan dan dengan ketebalan yang cukup sudah berhasil diselesaikan untuk beberapa isolat (Gambar 2). Faktor virus memengaruhi lesi penyakit ND pada organ predileksinya pada ayam, Angka kematian akibat dari infeksi virus tipe *viscerotropic velogenic* atau disebut juga tipe Asia mencapai 80-100%. Virus tipe Asia merupakan tipe yang paling ganas dan menyebabkan kerusakan yang dominan pada saluran pencernaan yang ditandai hemoragi dan nekrosis berat, bahkan nekrosis koagulasi ringan dapat ditemui pada hati, paru-paru, dan otak (Adi dan Astawa, 2014), sedangkan infeksi virus tipe *neurotropic velogenic* atau disebut juga tipe Amerika, angka kematiannya berkisar antara 60-80% dengan lesi yang dominan pada susunan saraf pusat dan sistem pernafasan.

Dari hasil penelitian ini, selain lesi pada saluran pencernaan lesi juga ditemukan pada otak dan paru-paru. Variasi molekuler APMV-1 berpengaruh terhadap

**Tabel 1.** Perolehan sampel ayam diduga terinfeksi *avian paramyxovirus* tipe 1 (APMV-1) pada kasus *suspect* penyakit *Newcastle disease* (ND) yang berasal dari peternakan komersial dan rumah tangga di Provinsi Bali

No	Kode	Anamnesis		Karakterisasi <i>infected allantoic fluid</i>	
		Gejala klinis		Uji HA (titer HA)	Uji HI
1	D1/AK/2014	Tortikolis* dan gangguan pernafasan		2 <sup>7</sup>	Positif APMV1
2	D2/AK/2014	Diare dan gangguan pernafasan		2 <sup>7</sup>	Positif APMV1
3	D3/AB/2014	Diare		2 <sup>5</sup>	Positif APMV1
4	D4/AB/2014	Diare		2 <sup>9</sup>	Positif APMV1
5	D5/AK/2014	Diare dan gangguan pernafasan		2 <sup>7</sup>	Positif APMV1
6	B1/AK/2014	Tortikolis		2 <sup>7</sup>	Positif APMV1
7	B2/AK/2014	Gangguan pernafasan		2 <sup>5</sup>	Positif APMV1
8	B3/AK/2014	Diare berdarah		2 <sup>4</sup>	Positif APMV1
9	B4/AK/2014	Tortikolis		2 <sup>7</sup>	Positif APMV1
10	B5/AB/2014	Diare		2 <sup>3</sup>	Positif APMV1
11	T1/ARP/2014	Gangguan pernafasan		2 <sup>4</sup>	Positif APMV1
12	T2/AB/2014	Diare		2 <sup>7</sup>	Positif APMV1
13	T3/AB/2014	Diare		2 <sup>6</sup>	Positif APMV1
14	T4/ARP/2014	Diare dan gangguan pernafasan		2 <sup>4</sup>	Positif APMV1
15	T5/ARP/2014	Tortikolis		2 <sup>7</sup>	Positif APMV1
16	G1/AK/2014	Gangguan pernafasan		2 <sup>7</sup>	Positif APMV1
17	G2/AK/2014	Gangguan pernafasan		2 <sup>3</sup>	Positif APMV1
18	K1/AB/2014	Diare		2 <sup>5</sup>	Positif APMV1
19	K2/ARP/2014	Gangguan pernafasan		2 <sup>9</sup>	Positif APMV1
20	K3/AK/2014	Gangguan pernafasan		2 <sup>7</sup>	Positif APMV1

\*= Tortikolis (*neurological disorder*) gerakan kepala ayam yang tidak terkoordinasi (terpuntir), D= Denpasar, B= Badung, T= Tabanan, G= Gianyar, K= Klungkung, AK= Ayam kampung, AB= Ayam broiler, ARP= Ayam ras petelur

**Tabel 2.** Gambaran mikroskopis otak, paru-paru dan usus dari sampel ayam

No	Organ	Lesi histopatologis (a/b)*	Keterangan
1	Otak	<i>Gliosis</i> (15/20) <i>Endotheliosis</i> (15/20) <i>Perivascular cuffing</i> (4/20)	Pengamatan dibatasi pada bagian korteks serebri
2	Paru	<i>Pneumonia interstitialis</i> (10/20) <i>Pneumonia lobaris</i> (1/20) Proliferasi pneumosit tipe 2(20/20)	Pengamatan seluruh paru-paru
3	Usus	Enteritis kataralis (15/20) Enteritis nekrotik dan hemoragi (2/20)	Pengamatan dibatasi pada daerah duodenum

\*a= Jumlah dengan lesi tertentu; b= Jumlah sampel yang diperiksa, *endotheliosis*= Proliferasi dari endotel; *gliosis*= Proliferasi sel glia

lesi yang ditimbulkan pada ayam. Kemampuan virus untuk mencapai susunan saraf pusat dipengaruhi oleh susunan asam amino pada *fusion protein cleavage site*, serta adanya gugus asam amino fenilalanin pada posisi asam amino nomor 117 (Kattenbelt *et al.*, 2006). Kombinasi lesi yang muncul pada kasus-kasus lapangan selain akibat faktor virusnya diduga erat hubungannya dengan faktor inang seperti umur, ras, dan imunitas yang akan memengaruhi keganasan dan distribusi lesi penyakit ND pada ayam.

### KESIMPULAN

Lesi mikroskopis yang ditemukan pada kasus penyakit ND dalam penelitian ini adalah pada otak ditemukan *perivascular cuffing*, *endotheliosis* dan *gliosis* dengan frekuensi masing-masing adalah 20, 75, dan 75%. Pada paru-paru, *pneumonia interstitialis*, *pneumonia lobaris*, dan proliferasi pneumosit tipe 2 dengan frekuensi berturut-turut 50, 5, dan 100%. Pada usus lesi mikroskopis yang ditemukan adalah enteritis kataralis (75%) dan enteritis nekrotik dan hemoragi (10%). Konfirmasi serologis dan molekuler dari 20 isolat yang diperoleh dalam penelitian ini adalah positif APMV-1.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dari Hibah Penelitian Desentralisasi Tahun anggaran 2014 dengan kontrak No. 101.2/UN14.2/PNL.01.03.00/2014 tanggal 3 Maret 2014. Penulis mengucapkan terima kasih kepada LPPM Universitas Udayana yang telah memfasilitasi pelaksanaan proyek hibah ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Adi, A.A.A.M. 2011. Biological and molecular studies on a pathogenic Newcastle disease virus isolated from a natural case in Indonesia. **Dissertation**. Tokyo University-Tokyo-Jepang.
- Adi, A.A.A.M. dan N.M. Astawa. 2006. Potensi virus ND sebagai agen anti kanker pada manusia. **J.Vet.** 7(4):185-188.
- Adi, A.A.A.M. dan N.M. Astawa. 2014. **Avian Paramyxovirus Tipe-1: Biologi dan Polimorfisme genetik**. Swasta Nulus, Denpasar.
- Adi, A.A.A.M., N.M. Astawa, K.S.A. Putra, dan Y. Matsumoto. 2008. Deteksi virus penyakit tetelo isolat lapangan dengan metode nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J. Vet.** 9(3):128-134.
- Alexander, D.J. 2003. Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviridae Infection. In **Diseases of Poultry**. Saif, Y.M., H.J. Barners, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. Mc Dougald, and D.E. Swayne (Eds.). 11<sup>th</sup> ed. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Czegledi, A., D. Ujvari, E. Somogyia, E. Wehmanna, O. Werner, and B. Lomniczi. 2006. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. **Virus Res.** 120:36-48.
- Kattenbelt, J.A., M.P. Stevens, and A.R. Gould. 2006. Sequence variation in the Newcastle disease virus genome. **Virus Res.** 116:168-184.
- Kinoh, H., M. Inoue, K. Washizawa, T. Yamamoto, S. Fujikawa, Y. Tokusami, A. Iida, Y. Nagai, and M. Hasegawa. 2004. Generation of a recombinant sendai virus that is selectiely activated and lyses human tumor cells expressing matrix metalloproteinases. **Gene Therapy.** 11:1137-1145.
- OIE. 2009. NDV in Indonesia. Detailed Country(ies) Disease Incidence. <http://www.oie.int/wahis/public.php>.
- Schirrmacher, V. 2005. Clinical trials of antitumor vaccination with an autologous tumor cell vaccine modified by virus infection : improvement of patient survival based on improved antitumor immune memory. **Cancer Immunol. Immunother.** 54:587-598.
- Springfield, C., V.von Messling, M. Frenzke, G. Ungerechts, C.J. Buchholz, and R.Cattaneo. 2006. Oncolytic efficacy and enhanced safety of measles virus activated by tumor-secreted matrix metalloproteinases. **Cancer Res.** 66(15):7694-7700.
- Wang, Z., H. Liu, J. Xu, J. Bao, D. Zheng, C. Sun, R. Wei, C. Song, and J. Chen. 2006. Genotyping of Newcastle disease viruses isolated from 2002 to 2004 in China. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1081:228-239.