

Perbandingan Sekuens Konsensus Gen Hemagglutinin Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Asal Unggas di Indonesia dengan Subtipe H5N2 dan H5N9

(COMPARISON OF CONSENSUS SEQUENCE OF HEMAGGLUTININ GENE OF AVIAN INFLUENZA VIRUS H5N1 SUBTYPE FROM FOWL IN INDONESIA WITH H5N2 AND H9N9 SUBTYPES)

I Gusti Ngurah Kade Mahardika^{1✉}, I Nyoman Suartha²,
Ida Bagus Kade Suardana¹, dan I Gusti Ayu Yuniati Kencana¹,
I Wayan Teguh Wibawan³

¹Lab Virologi Veteriner; ²Lab Penyakit Dalam Hewan Besar
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Jl. PB Sudirman Denpasar,
³Lab Imunologi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor
Email: gnmahardika@indosat.net.id
Telp/Fax : 0361-223791/0361-701808

ABSTRACT

Consensus sequence of hemagglutinin (HA) gene of avian influenza viruses of H5N1 subtype isolated from fowl in Indonesia – hereafter named as H5N1_Indonesia – is compared with that of H5N2 and H5N9 viruses. Sequence information were downloaded from the public database GeneBank. The genetic distances and nucleotide as well as its deduced amino-acid sequence alignment were analysed. At nucleotide level, genetic distances of HA between H5N1_Indonesia to H5N2 and H5N9 are 16.2% and 9.6%, respectively. At amino-acid level, the distances are 9.7% and 6.8%. The genetic distances of HA1 fragments are 19.0% (H5N1_Indonesia – H5N2) and 10.9% (H5N1_Indonesia – H5N9). At amino-acid, level the genetic distances of HA1 are 13.1% (H5N1_Indonesia-H5N2) and 8.8% (H5N1_Indonesia – H5N9). All three subtypes have different glycosilation motive and variation of amino-acid sequence of four antigenic sites. The consequence of those facts is discussed.

PENDAHULUAN

Virus Avian Influenza (VAI) yang sangat patogen (*highly pathogenic avian influenza virus*/HPAI) subtipe H5N1, telah menyebabkan sampar ayam (*fowl plague*) pada unggas di Indonesia sejak akhir 2003 sampai sekarang (Komnas FBPI, 2008). Ratusan juta ayam dan itik telah dimusnahkan untuk menghentikan laju pesebarannya. Di samping menyebabkan kerugian ekonomi yang besar dan ancaman pada ketahanan pangan, virus HPAI ini juga telah terbukti dapat melompati barrier spesies unggas – manusia dan telah menyebabkan kematian pada manusia di Indonesia (Kandun *et al.*, 2006).

Sampai saat ini, sumber penularan pada manusia masih dianggap berasal dari unggas. Karenanya, pencegahan infeksi pada unggas sangat penting. Strategi yang umum dilakukan untuk pengendalian AI pada unggas adalah pemusnahan unggas yang tertular dalam radius tertentu (*stamping out/preemptive culling*), biosekuriti, dan vaksinasi. Vaksinasi telah menjadi salah satu strategi utama untuk penanggulangan AI di Indonesia (OIE 2005).

Berbagai sediaan vaksin AI untuk unggas telah banyak dicoba. Akan tetapi sediaan yang umum untuk penggunaan komersial adalah vaksin virus inaktif dalam *adjuvan* minyak. Kandungan virus didalam vaksin dapat homolog dan heterolog. Vaksin AI homolog adalah vaksin yang mempunyai kandungan antigen, terutama komponen hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) yang sama dengan virus AI yang sedang berjangkit di wilayah yang bersangkutan. Vaksin dengan kandungan virus mati subtipe H5N1 di Indonesia tergolong vaksin homolog. Sedangkan vaksin AI heterolog adalah vaksin yang mempunyai kandungan HA yang sama dan NA yang berbeda dengan virus yang sedang berjangkit (Capua *et al.*, 2003; OIE, 2005). Vaksin-vaksin dengan kandungan virus H5N2 dan H5N9 yang digunakan di Indonesia tergolong ragam vaksin heterolog.

Akhir-akhir ini, banyak peternak mengeluh tentang daya-perlindungan vaksin heterolog. Beberapa dokter hewan konsultan peternakan yang berlokasi di Bali yang rutin mengirim sampel serum ke Lab Biomedik FKH Unud Denpasar untuk pengujian titer antibodi AI H5,

menyampaikan bahwa mereka baru merasa aman dengan titer antibodi AI yang tinggi (lebih dari 2^7 unit) jika menggunakan vaksin heterolog. Menurut mereka, jika titernya lebih rendah dari angka tersebut, sekalipun tergolong titer yang protektif menurut Deptan-Dirkeswan (2005) (diatas 2^4 unit), sering terjadi kematian akibat AI atau penurunan produksi telur yang tajam (sampai 40%) yang diduga akibat infeksi AI subklinis.

Informasi genetik gen hemagglutinin virus AI H5N1 asal unggas di Indonesia dan semua virus AI subtipe H5N2 dan H5N9 yang tersedia di *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database>) dianalisis dalam tulisan ini.

MATERI DAN METODE

Sekuens konsensus dari gen hemagglutinin dari virus AI H5N1 asal unggas di Indonesia dan semua virus AI subtipe H5N2 dan H5N9 diperoleh dari *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database>) dan dipilih informasi isolat yang sekuensnya tersedia lengkap (*full length*). Data tersebut selanjutnya dianalisis dengan piranti lunak Mega 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). Hal-hal yang dianalisis adalah jarak genetik (*genetic distance*) pada tingkat nukleotida dan asam amino serta penjarangan (*alignment*) sekuens asam amino fragmen gen HA-1.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis data sekuens nukleotida dan asam amino konsensus dari protein HA dari virus-virus H5N2, H5N9, dan H5N1 asal hewan yang diisolasi di Indonesia (Tabel 1) menunjukkan bahwa virus H5N2 dan H5N9 secara genetik berbeda cukup jauh dengan virus H5N1 hewan Indonesia. Pada tingkat nukleotida, jarak antara virus H5N2 dan H5N9 dengan virus H5N1 Indonesia adalah masing-masing 16,2% dan 9,6%. Pada tingkat asam amino, jarak tersebut adalah 9,7% (H5N2 dengan H5N1_Indonesia) dan 6,8% (H5N9 dengan H5N1_Indonesia).

Jarak genetik tersebut lebih tinggi pada fragmen HA1 (Lihat Tabel 2). Pada tingkat asam nukleat, jarak genetik itu menjadi 19,0% (H5N2 dengan H5N1_Indonesia) dan 10,9% (H5N9- H5N1_Indonesia). Pada asam amino, jarak antara H5N2 dengan H5N1_Indonesia adalah 13,1% dan antara H5N9 dengan H5N1_Indonesia adalah 8,8%.

Jumlah asam amino dari fragmen HA1 yang berbeda antara virus H5N1_Indonesia dengan H5N2 adalah 36 asam amino; sedangkan antara virus H5N1 Indonesia dengan H5N9 adalah 26 asam amino. Satu insersi/delesi ditemukan pada segmen di luar tempat pemotongan protease (*cleavage site*), yaitu insersi N139 hanya ditemukan pada virus H5N2.

Sekuens konsensus ketiga virus juga berbeda pada pola glikosilasi (Gambar 1). Glikosilasi N155 hanya terjadi pada virus H5N1 Indonesia. Sedangkan glikosilasi N194 terjadi pada virus H5N9 dan H5N1 Indonesia, dan tidak pada H5N2.

Glikosilasi yang disebut terakhir tersebut terjadi pada lokasi antigenik-3. Perbandingan sekuens asam amino pada empat lokasi antigenik yang dapat diidentifikasi (Gambar 1) menunjukkan bahwa selalu terdapat 1-2 asam amino yang berbeda antara virus H5N1_Indonesia dengan virus H5N2 dan H5N9.

Tabel 1. Jarak Genetik (%) pada tingkat Asam Nukleat (nt) dan Asam Amino (aa) Seluruh Protein Hemagglutin H5 (full length) dari Sekuens Konsensus Virus-Virus Avian Influenza Subtipe H5N2, H5N9, dan H5N1_Indonesia.

	H5N2	H5N9	H5N1_Indonesia
H5N2		4,2% (aa)	9,7% (aa)
H5N9	12,7% (nt)		6,8% (aa)
H5N1_Indonesia	16,2% (nt)	9,6% (nt)	

Tabel 2. Jarak Genetik (%) pada tingkat Asam Nukleat (nt) dan Asam Amino (aa) Fragmen HA1 Protein Hemagglutin H5 dari Sekuens Konsensus Virus-Virus Avian Influenza Subtipe H5N2, H5N9, dan H5N1_Indonesia.

	H5N2	H5N9	H5N1_Indonesia
H5N2		6,3% (aa)	13,1% (aa)
H5N9	13,9% (nt)		8,8% (aa)
H5N1_Indonesia	19,0% (nt)	10,9% (nt)	

#HA_H5N2	DQICIGYHAN	<u>N</u> STEQVDTIM	<u>E</u> KNVTVTHAQ	DILEKEHNGK	LCSLKGVKPL	[50]
#HA_H5N9T.....N.....	[50]
#HA_H5N1T.....D.D.....	[50]
#HA_H5N2	ILKDCSVAGW	LLGNPMCDEF	LNVPESYIV	EKDNFVNGLC	YPGDFNDYEE	[100]
#HA_H5N9	..R.....	[100]
#HA_H5N1	..R.....	I.....	..A..A.D..	..N.....	[100]
	Lokasi Antigenik-1			Lokasi Antigenik-2		
#HA_H5N2	LKHLMS	<u>S</u> TNH FEKIQ	<u>I</u> PR	SWSNHDASSG	VSSACPYYNG	<u>R</u> SSFFRNVVW [150]
#HA_H5N9L.N-	[150]
#HA_H5N1L.K.	...D.E...L-	[150]
	Lokasi Antigenik-3					
#HA_H5N2	LIKKNAYPT	IKRTYNNTNL	EDLLILWGIH	HPNDAAEQTK	<u>L</u> YQNPNTYVS [200]	
#HA_H5N9S...QVT...	[200]
#HA_H5N1ST...	...S...QVRT..I.	[200]
	Lokasi Antigenik-4					
#HA_H5N2	VGTSTLNQRS	IPEIATP	<u>P</u> KV	NGQSGRMEFF	WTILKPNDAI	NFESNGNFIA [250]
#HA_H5N9	V.....	[250]
#HA_H5N1L	V.K.	[250]
#HA_H5N2	PEYAYKIVKK	GDSAIMKSEL	EYGNCTKCQ	TPVGAINSSM	PFHNVHPLTI	[300]
#HA_H5N9G.M.....I.....	[300]
#HA_H5N1M.....I.....	[300]
	Lokasi Cleavage site					
#HA_H5N2	GECPKYVKSD	KLVLATGLRN	V	<u>P</u> QR--RRET	<u>R</u> G	[332]
#HA_H5N9	R.....	I.....	----	..	[332]
#HA_H5N1N	R.....	S.....	ER..KK	..	[332]

Gambar 1. Hasil Penjajaran Sekuens Asam Amino Konsensus Virus AI Subtype H5N2, H5N9, dan H5N1_Indonesia. Asam amino ditulis dengan sandi satu huruf (*single letter code*). 16 Asam Amino awal pada *open reading frame* (ORF) dihilangkan. Angka dalam kurung pada akhir baris menunjukkan nomor asam amino yang terakhir pada baris itu. Tanda titik (.) menunjukkan bahwa asam amino pada posisi itu sama dengan asam amino pada H5N2. Tanda (-) menunjukkan delesi pada posisi yang bersangkutan. Pola glikosilasi NXT/NXS digaris-bawahi. Perkiraan posisi lokasi antigenik (1-4) diarsir warna abu-abu. Lokasi *cleavage site* ditandai dengan kotak tebal.

Publikasi tentang genotipe virus AI H5N1 asal Indonesia menunjukkan bahwa virus tersebut telah berevolusi dan kian menyebar di Indonesia melalui perantara lalu lintas unggas dan produk perunggasan (Li *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006a). *Reassortment* genetik dan peran burung liar migratori belum teridentifikasi (Smith *et al.*, 2006b).

Smith dkk. (2006a) melaporkan bahwa semua virus Indonesia yang dianalisis berada dalam satu *cluster* yang mengindikasikan introduksi virus awal yang sama. Analisis lebih lanjut menunjukkan bahwa virus H5N1 Indonesia membentuk tiga sub-kelompok genetik (Smith *et al.*, 2006a; Chen *et al.*, 2006). Sub-kelompok A ditemukan di Jawa, Sulawesi Selatan, dan Timor Barat. Sub-kelompok B terisolasi dari Jawa, Bali, Flores dan Timor Barat. Sementara sub-kelompok C berasal dari isolat Jawa dan Sumatra.

Perkembangan tersebut mempengaruhi struktur antigenik virus AI yang menyebar di Asia, termasuk Indonesia. Kajian yang dilaporkan oleh Smith *et al.*, (2006a) dan juga Chen *et al.*, (2006) menunjukkan bahwa virus-virus asal Indonesia tidak bereaksi dengan antibodi terhadap representatif virus asal Vietnam, demikian juga sebaliknya, namun masih menunjukkan reaksi silang dengan virus asal Hong Kong dan Cina. Di samping itu, variasi antigenik juga tampak sekali di antara virus-virus asal Indonesia. Variasi antigenik tersebut bahkan ditunjukkan dengan titer antibodi terhadap virus-virus dari masing-masing subkelompok sampai empat log (Smith *et al.*, 2006a).

Bukti ilmiah yang dipaparkan di atas menunjukkan bahwa penggunaan vaksin heterolog mesti dilakukan dengan hati-hati. Jika virus-virus H5N1 asal Indonesia tidak

bereaksi dengan antibodi terhadap representatif virus asal Vietnam dan hanya menunjukkan reaksi silang yang tidak sempurna dengan virus asal Hong Kong dan Cina serta adanya reaksi silang yang tidak sempurna antar virus-virus asal Indonesia, penggunaan vaksin heterolog dengan H5 yang tidak berasal dari Indonesia secara logis tidak sesuai, walau pun reaksi silang juga terjadi.

Pengamatan lebih seksama pada fragmen HA1 yang diketahui mempunyai fungsi vital untuk patogenitas dan kekebalan terhadap AI (Harimoto dan Kawaoka, 2001), menunjukkan bahwa selalu terdapat 1-2 asam amino yang berbeda antara virus H5N1 Indonesia dengan virus H5N2 dan H5N9 pada keempat lokasi antigenik yang diidentifikasi. Sekuens konsensus ketiga virus juga berbeda pada pola glikosilasi. Salah satu perbedaan motif glikosilasi terjadi pada lokasi antigenik-3.

Fakta yang diuraikan di atas juga mempunyai implikasi yang besar dalam pemilahan bibit vaksin yang hendak digunakan di suatu wilayah. Idealnya, vaksin yang digunakan mestinya mempunyai homologi genetik dan antigenik yang mendekati sempurna dengan virus yang beredar di wilayah yang bersangkutan. Untuk wilayah yang mempunyai virus yang berasal dari satu subkelompok, vaksin yang digunakan idealnya mengandung antigen dari masing-masing subkelompok.

Hal itulah yang mendasari keluhan sebagian kalangan dalam penggunaan vaksin heterolog. Penggunaan bibit vaksin yang tidak sesuai dapat menurunkan protektivitas vaksin. Kasus-kasus kegagalan vaksinasi mungkin akan semakin sering terjadi. Kalau pun unggas yang divaksin tetap tidak menunjukkan gejala klinis yang nyata, penurunan produksi dan tingginya beban virus (*virus burden*) pada lingkungan dapat menjadi konsekuensi logis pada penggunaan bibit yang tidak sesuai. Dengan demikian risiko kerugian ekonomi dan kesehatan masyarakat akan tetap tinggi.

Jika antara virus AI-H5N1 Indonesia saja terjadi reaksi silang yang tidak sempurna (Smith *et al.*, 2006a), sementara rata-rata jarak genetiknya antara 1-2%, proteksi yang tidak sempurna juga tampaknya terjadi akibat penggunaan vaksin yang heterolog H5N2 atau H5N9.

Bukti pemaknaan biologi dari keragaman genetik virus AI H5N1 Indonesia dan daya

perlindungan vaksin homolog dan heterolog perlu dikaji lebih lanjut. Bukti yang tersedia saat ini cukup kuat sebagai dasar untuk mengatakan vaksin yang ideal dan dapat digunakan untuk seluruh Indonesia adalah vaksin campuran yang mengandung representasi ketiga kelompok virus AI H5N1 Indonesia. Representatif ketiga kelompok itu telah dikarakterisasi dan tersedia di Laboratorium Biomedik FKH Universitas Udayana, Denpasar (Mahardika *et al.*, 2004; Mahardika dan Tim Kajian AI FKH Unud, 2006a; Mahardika dan Tim Kajian AI FKH Unud 2006b).

Teknologi produksinya dapat konvensional, yaitu dengan inaktivasi virus HPAI, atau teknologi modern *reverse genetic*. Dalam teknologi terakhir, vaksin dapat berupa homolog, yaitu komponen H dan N dari virus Indonesia, atau heterolog, yaitu hanya komponen H-nya dari virus Indonesia, sementara segmen yang lain dari bibit yang telah diadaptasikan dengan baik untuk bibit vaksin.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Pada tingkat nukleotida, jarak genetik HA antara H5N1_Indonesia dengan H5N2 and H5N9 adalah 16,2% dan 9,6%. Pada tingkat asam amino, jaraknya adalah 9,7% dan 6,8%.

Jarak genetik fragmen HA1 adalah 19.0% (H5N2-H5N1_Indonesia) dan 10.9% (H5N9-H5N1_Indonesia). Pada tingkat asam amino, jarak genetik fragmen HA1 adalah 13.1% (H5N2-H5N1_Indonesia) dan 8.8% (H5N9 – H5N1_Indonesia).

Ketiga subtipe mempunyai motif glikosilasi yang berbeda serta sekuens asam amino yang bervariasi dalam 1-2 asam amino pada keempat lokasi antigenik yang diamati.

Saran

Pemaknaan biologi perbedaan genetik antara virus AI H5N1 Indonesia dengan H5N2 dan H5N9 dalam daya perlindungan vaksin heterolog perlu segera dikaji lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

- Capua I, Terregino C, Cattoli G, Mutinelli F, Rodriguez JF. (2003). Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol* 32 : 47–55.

- Chen H, Smith GJD, Li KS, Wang J, Fan XH, Rayner JM, Vijaykrishna D, Zhang J, Zhang LJ, Guo CT, Cheung CL, Xu KM, Duan L, Huang K, Qin K, Leung YHC, Wu WL, Lu HR, Chen Y, Xia NS, Naipospos TSP, Yuen KY, Hassan SS, Bahri S, Nguyen TD, Webster RG, Peiris JSM, Guan Y. 2006. Establishment of multiple sublineages of h5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2845-2850
- Deptan-Dirkeswan, 2005. Pedoman Surveilans dan Monitoring Avian Influenza di Indonesia. Jakarta.
- Harimoto T, Kawaoka Y. 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *Clin Microbiol Rev* 14: 129-149.
- Kandun IN, Wibisono H, Sedyaningsih ER, Yusharmen, Hadisoedarsuno W, Purba W, Santoso H, Septiawati C, Tresnaningsih E, Heriyanto B, Yuwono D, Harun S, Soeroso S, Giriputra S, Blair PJ, Jeremijenko A, Kosasih H, Putnam SD, Samaan G, Silitonga M, Chan KH, Poon LL, Lim W, Klimov A, Lindstrom S, Guan Y, Donis R, Katz J, Cox N, Peiris M, Uyeki TM, 2006. Three Indonesian clusters of H5N1 virus infection in 2005. *N Engl J Med* 355(21):2186-94
- Komnas FBPI, 2008. Tentang Flu Burung. http://www.komnasfbpi.go.id/aboutai_ind.html. Akses Tanggal 7 Mei 2008.
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*. 5 (2) : 150–163.
- Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, Rahardjo AP, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Es-toepangestie AT, Chaisingh A, Auewarakul P, Long HT, Hanh NT, Webby RJ, Poon LL, Chen H, Shortridge KF, Yuen KY, Webster RG, Peiris JS. 2004. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*. 430:209-213
- Mahardika, I G N dan Tim Kajian AI FKH Unud, 2006a. *Laporan Surveillance AI di Bali, NTB, dan NTT Tahun 2005*. FKH Unud, Denpasar, 2006.
- Mahardika, I G N dan Tim Kanjian AI FKH Unud, 2006b. *Laporan Kajian AI pada Babi dan Monyet Tahun 2006*. FKH Unud, Denpasar, 2006.
- Mahardika IG NK, Sibang M, Suamba M, Adnyana KA, Dewi NMS, Meidiyanti KA, Paulus YA. (2004). Isolasi Virus Influenza pada Ayam Kampung di Bali. *J Vet*. 35, 45.
- OIE, 2005. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2004. Version Adopted May 2005, Chapter 2.7.12., Avian Influenza. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00037.htm; Akses Tanggal 7 Mei 2008.
- Smith GDJ, Fan XH, Wang J, Li KS, Qin K, Zhang JX, Vijaykrishna D, Cheung CL, Huang K, Rayner JM, Peiris JSM, Chen H, Webster RG, Guan Y. 2006b. Emergence and predominance of an H5N1 influenza variant in China. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 16936-16941.
- Smith GDJ, Naipospos TSP, Nguyen TD, Jong MD je, Vijaikrishna D, Usman TB, Hassan SS, Nguyen TV, Dao TV, Bui NA, Leung YILC, Cheung CL, Rayner JM, Zhang JX, Zhang LJ, Poon LLM, Li KS, Nguyen VC, Hien TT, Farrar J, Webster RG, Chen H, Peiris JSM, Guan Y. 2006a. Evolution and Adaptation of H5N1 Influenza Virus in Avian and Human Hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology* 322.