

Pelacakan Secara Immunohistokimiawi Antigen Virus pada Ayam yang Diinfeksi dengan Virus Penyakit Tetelo

(IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF VIRAL ANTIGEN IN TISSUE OF CHICKENS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH NEWCASTLE DISEASE VIRUS)

Anak Agung Ayu Mirah Adi¹, I Made Kardena¹,
Nyoman Mantik Astawa², Yasunobu Matsumoto³

¹Laboratorium Patologi dan ²Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Udayan Denpasar, Bali, Indonesia 80232 Tel/Fax. 0361223791,
Email: mirah638@yahoo.co.id

³Laboratory of Global Animal Resource Science, Department of Global Agricultural Sciences,
Graduate School of Agricultural and Life Sciences, the University of Tokyo,
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.

ABSTRAK

Untuk mengetahui distribusi virus pada organ terinfeksi virus ND, ayam diinfeksi dengan isolat virus ND tipe *viscerotropic velogenic*. Selanjutnya untuk melacak virus ND, dibuat antibodi monoklonal (AbMo) terhadap virus ND vaksin strain LaSota. AbMo tersebut diuji dengan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) dan AbMo yang spesifik mengenali virus ND kemudian dipakai untuk melacak virus ND pada jaringan ayam terinfeksi. Sebanyak delapan AbMo diproduksi dalam penelitian ini dan dua di antaranya bereaksi kuat dengan virus ND digunakan dalam pewarnaan imunohistokimia dengan metode LSAB. Antigen virus ND terlacak pada jaringan ayam yang difiksasi dengan formalin. Pada ayam terinfeksi, antigen virus ND dengan intensitas yang tinggi ditemukan pada organ limfoid, paru dan usus. Antigen virus ND dengan intensitas lebih rendah juga terlacak pada otak, trakea, hati dan otot jantung. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa walaupun hampir semua organ ayam dapat terinfeksi virus, target utama infeksi virus ND pada penelitian ini adalah paru, usus, dan jaringan limfoid.

Kata kunci : Virus ND, LaSota, antibodi monoklonal, streptavidin biotin

ABSTRACT

In order to study the distribution of Newcastle disease virus (NDV) following infection, chickens were experimentally infected with viscerotropic velogenic NDV isolate. Monoclonal antibodies (mAbs) against the NDV LaSota vaccine strain were then produced to detect viral antigen in the infected organs. The mAbs were firstly tested for their specificity by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using NDV and normal allantoic fluids as antigens. Eight mAbs specific against NDV were isolated and two mAbs were used for immunodetection of NDV antigen in chicken's tissues. By immunohistochemistry labeled streptavidin-biotin (LSAB) staining NDV-antigen was detected in paraffin embedded tissues of NDV-infected chickens. NDV antigen was not detected in non infected chickens. In the infected chickens, high intensity of NDV antigen was detected in the lymphoid tissues, lung and intestine. The NDV antigen with a lesser intensity was detected in the brain, trachea, liver and myocardium. This study shows that although viscerotropic velogenic NDV isolate can infect almost all organs, the main target of infection are lung, intestine and lymphoids tissues

Key words : Newcastle disease, LaSota, monoclonal antibodies, streptavidin biotin

PENDAHULUAN

Newcastle Disease (ND) atau juga disebut penyakit tetelo merupakan salah satu penyakit yang sangat penting pada unggas. Penyebab penyakit ini tergolong dalam famili *Paramyxoviridae* dengan subgenus *Avian Paramyxovirus serotype 1* (APMV-1). Virus tersebut adalah virus RNA (*ribonucleic acid*) beramplop yang memiliki polaritas negatif dengan asam inti berantai tunggal dan tidak bersegmen. Panjang genomnya 15.186 basa terdiri atas enam gen yang menyandi enam polipeptida yakni nukleokapsid protein (NP), fosfoprotein (P), matrix (M), fusion (F), hemagglutinin-neuraminidase (HN) dan RNA polymerase (L) dengan susunan 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' (de Leeuw dan Peeters, 1999). Susunan asam amino pada daerah F protein *cleavage site* sangat menentukan kemampuan virus ND masuk ke dalam sel inang. Virus ND virulen memiliki susunan asam amino ¹¹²R/K-R-Q-R/K-R¹¹⁶, dengan *phenylalanine* (F¹¹⁷) pada ujung N terminalnya. Susunan asam amino tersebut menyebabkan virus dapat menginfeksi berbagai sel, sehingga virus ND virulen bersifat pantropik (Collins *et al.*, 1993; Yusoff dan Tan, 2001; Kattenbelt *et al.*, 2006). Sementara itu virus avirulen memiliki motif F protein *celavage site* ¹¹²R/G-R/K-Q-G-R¹¹⁶ dengan leucine (L¹¹⁷) pada ujung N terminalnya yang menyebabkan virus hanya mampu menginfeksi sel tertentu pada saluran pernafasan dan pencernaan (Nagai, 1993; Collins *et al.*, 1993; Romer-Oberdofer, 2003).

Pada unggas yang rentan, infeksi virus ND yang sangat ganas (velogenik) dapat menyebabkan kematian sampai 100% (Alexander, 2003). Untuk mengontrol penyakit ND sangat tergantung terutama pada keakuratan diagnosis. Kemampuan mendeteksi agen penyakit secara cepat dan akurat merupakan syarat utama sebuah metode diagnostik. Dalam hal ini prosedur uji serologi dan virologi telah diketahui sangat mahal, memerlukan waktu dan tidak praktis. Mengingat waktu yang dibutuhkan untuk mengisolasi virus pada telur bertunas kurang lebih lima hari kemudian diikuti dengan uji HA dan HI untuk identifikasi virus. Untuk menegakkan diagnosis sedikitnya diperlukan waktu satu minggu (Jestin dan Jestin, 1991).

Salah satu alternatif cara penegasan diagnosis ND pada berbagai jenis inang yang rentan adalah uji imunohistokimia. Keung-

gulan teknik ini adalah (1). Dapat melacak distribusi virus pada berbagai organ sehingga dapat dipakai untuk mengetahui pathogenesis infeksi virus ND pada ayam, (2). Aman karena dilakukan pada organ yang telah difiksasi dengan formalin sehingga virus ND yang dilacak adalah virus yang sudah inaktif. Dengan demikian penularan pada inang yang peka dapat dihindari. (3). Penggunaan AbMo sebagai antibodi primer dan metode *labeled streptavidin biotin* (LSAB) dapat meningkatkan akurasi uji. AbMo merupakan antibodi yang hanya berikatan dengan 1 epitop pada struktur antigen (Michelle, 2006; Kimbal, 2008) sehingga dapat mengenali antigen virus ND dalam organ dengan spesifisitas yang tinggi. Sementara itu, penggunaan metode LSAB dapat meningkatkan sensitivitas uji karena dalam satu molekul streptavidin terdapat empat situs pengikatan (*binding sites*) terhadap Biotin (Howarth *et al.*, 2006) sehingga diharapkan sensitivitasnya empat kali lebih tinggi dibanding metode IHK biasa. Untuk mengetahui akurasi imunohistokimia metode LSAB menggunakan AbMo dapat dipakai untuk melacak infeksi virus ND pada ayam, dilakukan penelitian pada ayam yang diinfeksi dengan virus ND tipe *viscerotropic velogenic*.

METODE PENELITIAN

Produksi dan karakterisasi antibodi monoklonal ND

Virus yang digunakan untuk pembuatan antibodi monoklonal (AbMo) adalah virus ND strain LaSota yang berasal dari vaksin ND hidup (Medivac-Medion, Bandung). Virus ND diperbanyak dalam telur ayam berembrio (TAB) umur 9-11 hari. Cairan *allantois* dipanen dan diuji dengan uji HA/HI untuk menentukan titer dan mengkonfirmasi virus ND. Cairan *allantois* yang mengandung titer virus lebih besar atau sama dengan 2⁹ kemudian digunakan untuk mengimunisasi mencit. AbMo terhadap virus ND diproduksi mengikuti metode Ohnishi *et al.*, (2005) dengan sedikit modifikasi. Mencit Balb/c betina berumur 6-8 minggu diimunisasi empat kali. Imunisasi pertama dengan 0,2 ml emulsi virus ND dengan *Freund's complete adjuvant* yang setara dengan 2¹¹ HA unit virus, diberikan secara intraperitoneal. Imunisasi kedua dilaksanakan 10 hari dari imunisasi pertama dengan 0,2 ml emulsi virus ND dengan *Freund's incomplete adjuvant* yang setara dengan 2¹¹ HA

unit virus. Imunisasi ketiga dan keempat dilaksanakan secara berturut-turut dua minggu dari imunisasi sebelumnya, dengan rute pemberian dan dosis virus yang sama. Seminggu sebelum fusi serum mencit diambil untuk uji HI dan ELISA. Limfosit asal mencit yang telah diimunisasi dengan virus ND kemudian difusi dengan sel *myeloma* menggunakan *polyethylene glycol* (PEG) 45 %. Klone sel hibridoma hasil fusi yang menghasilkan AbMo khas virus ND ditentukan dengan ELISA menggunakan virus ND sebagai antigen. AbMo stok ini dibuat dengan cara menumbuhkan hibridoma dalam media DMEM-HT (Dulbecco's Minimal Essential Medium-Hypoxantine Thymidine) sampai terlihat tanda-tanda kematian sel. Cairan supernatannya kemudian ditampung, disimpan pada suhu -20°C dan dipakai sebagai stok AbMo.

Infeksi buatan virus ND pada ayam

Dua kelompok ayam petelur jantan strain ISA Brown umur tiga minggu masing-masing terdiri atas lima ekor ayam dipelihara secara terpisah. Kelompok I (*infected group*) diinokulasi dengan 0,2 ml inokulum virus ND yang mengandung 10^5 TC ID₅₀ virus ND isolat ganas (Adi, 2011) Rute inokulasi secara intraokuler. Sementara kelompok kedua (*noninfected group*) diinokulasi dengan 0,2 ml PBS (*Phosphate Buffer Saline*) dengan rute yang sama. Ayam yang mati pascainokulasi dinekropsi. Sampel otak, paru, usus dua belas jari dengan pankreas, lambung kelenjar, jantung, limpa dan bursa fabricius diambil untuk diproses lebih lanjut sesuai metode standar penyiapan preparat *Paraffin embedded tissue*. Pada hari ke-10 pasca inokulasi seluruh ayam yang masih hidup dinekropsi serta organnya diambil untuk diproses lebih lanjut.

Uji immunohistokimia LSAB

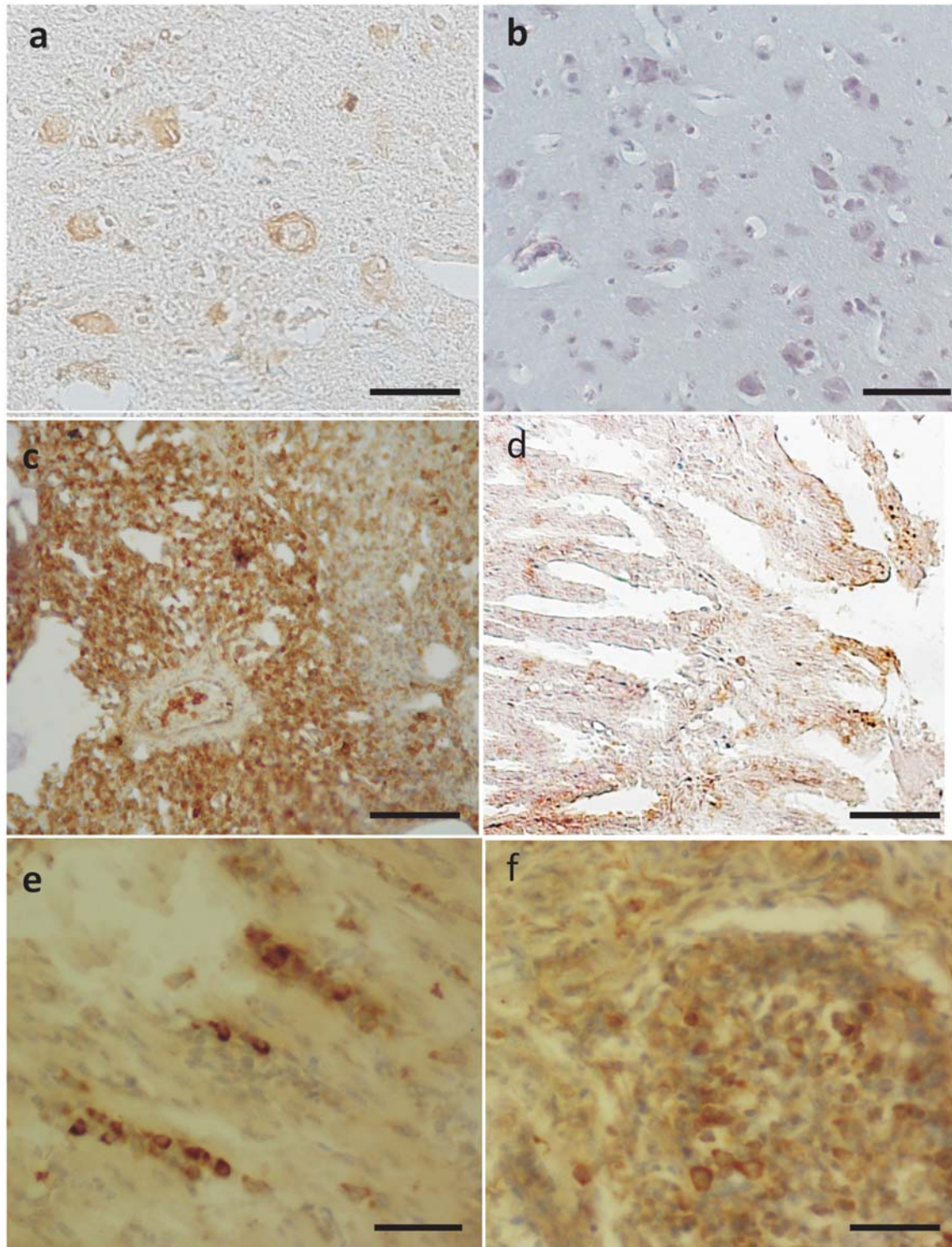
Uji IHC ini mengacu kepada metode yang dilakukan oleh Naqi (1990) dengan beberapa modifikasi. *Paraffin embedded tissue* dipotong dengan *microtome* dengan ketebalan 3-5 µm. Potongan terbaik diletakkan pada gelas objek, selanjutnya dideparafinisasi dengan cara direndam dalam larutan xylol III, II, dan I masing-masing selama tiga menit. Dilanjutkan dengan rehidrasi dengan alkohol absolut III, II, dan I masing-masing selama tiga menit. Selanjutnya direndam dengan aquabidest selama 15 menit (*stopping point*). Epitop dibuka dengan *trypsin treatment* 0,1% (0,1 g tripsin

dalam 100 ml PBS). Untuk menghentikan kerja enzim, sediaan direndam dalam aquabidest selama 5 menit dan dalam PBS selama 5 menit. Untuk memblokir *peroksidase endogen slide* direndam dengan H₂O₂ (1 ml) dalam methanol (100 ml) selama 15 menit. Sediaan kemudian dicuci dengan aquabidest selama 5 menit diikuti dengan PBS selama 5 menit. Sediaan diblocking dengan susu skim (*skim milk/SM*) 2% (2 g susu skim dalam 100 ml PBS). Sediaan preparat disimpan dalam kotak beralaskan kertas basah kemudian diinkubasi pada inkubator bersuhu 37 ° C selama 45 menit.

Selanjutnya penambahan antibodi primer yakni 60 µl MoAb antiNDV yang telah diencerkan 100 kali (1 µl MoAb + 99 µl PBS) diteteskan pada setiap sediaan, kemudian diinkubasikan pada suhu 4°C selama 12-16 jam (*overnight/on*). Setelah inkubasi preparat dicuci dengan PBS selama 10 menit sebanyak tiga kali, kemudian ditambahkan antibodi sekunder sebanyak 60 µl per preparat. Antibodi sekunder yang digunakan adalah *biotynilated goat anti mouse IgG* (Biodesign International, Saco, ME) dengan pengenceran 1:100 dalam *PBS-SM* 2%. Sediaan kemudian diinkubasikan pada inkubator pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya sediaan kemudian ditetesi dengan 60 µl *streptavidin horse radish peroksidase* (HRP)(Sigma CO., Ronkonkoma, NY; yang telah diencerkan 200 kali dengan pengencer *PBS-SM* 2%). Setelah diinkubasikan selama 20 menit dalam suhu ruang, sel yang terinfeksi divisualisasikan dengan penambahan 60 µl substrat *diamino benzydine* (DAB)(Sigma Co.). Konsentrasi DAB yang digunakan adalah 2 mg DAB dalam 1 µl PBS kemudian ditambahkan H₂O₂ 15 µl. Setelah penambahan DAB preparat diinkubasikan dalam ruang gelap selama 25 menit. Untuk menghentikan kerja substrat, preparat direndam dalam aquabidest selama lima menit. Sediaan kemudian diwarnai dengan pewarnaan Meyer's hematoxylin

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini dipilih dua AbMo yang menunjukkan reaksi paling kuat pada uji ELISA yaitu DD10 dan BA10. Kedua AbMo tersebut menunjukkan nilai absorban tertinggi pada uji ELISA dan tidak bereaksi dengan antigen normal yaitu cairan *allantois* yang tidak mengandung virus ND. Untuk uji IHC, kedua AbMo tersebut dicampur supaya mendapatkan



Gambar 1. *NDV antigen positive cells* pada berbagai organ ayam yang mati pasca inokulasi dengan 10^5 TC ID₅₀ virus ND tipe *viscerotropic velogenik*. Pewarnaan dengan metode IHK menggunakan monoklonal antibodi NDV serta antibodi sekunder *biotinylated goat antimouse IgG*, ikatan kompleks ag-ab dilacak dengan streptavidin HRP dan divisualisasikan dengan substrat DAB. Sel positif pada sel neuron di daerah cortex cerebri otak besar (a) paru-paru (c), di bagian kelenjar lambung kelenjar (d), otot jantung (e) dan di daerah folikuler bursa fabricius (e) sel positif tidak ditemukan pada berbagai organ termasuk otak (b) ayam yang diinokulasi dengan PBS (pada a,b,e dan f, skala = 50 μ m pada c dan d skala=100 μ m)

Tabel 1. Frekuensi *Antigen positive cell* pada sampel organ ayam pasca inokulasi dengan virus ND *viscerotropic velogenic*. Kelompok I (*infected*) terdiri atas 5 ekor ayam berumur 3 minggu yang diinokulasi dengan sementara kelompok NI (*Non infected*), terdiri atas 5 ekor ayam yang diinokulasi dengan PBS.

Organ	Kelompok I (a/b)	Kelompok NI (a/b)
<i>Cerebrum</i>	1/5	0/5
<i>Trachea</i>	3/5	0/5
<i>Pulmonun</i>	5/5	0/5
<i>Duodenum</i>	5/5	0/5
<i>Proventriculus</i>	5/5	0/5
<i>Hepar</i>	4/5	0/5
<i>Spleen</i>	5/5	0/5
<i>Bursa fabricius</i>	5/5	0/5

Keterangan: a jumlah sampel positif ; b jumlah sampel yang diperiksa
I: *Infected*; NI: *Non Infected*

intensitas warna yang lebih kuat. Pada uji ikatan antara antigen virus ND dengan AbMo ND akan dikenali oleh antibodi sekunder berlabel biotin. Ikatan Ag-MoAb-Ab sekunder berlabel biotin akan berikatan dengan streptavidin. Afinitas streptavidin terhadap biotin jauh lebih tinggi dibandingkan dengan avidin mengingat streptavidin memiliki empat *binding site* sehingga mampu mengikat empat molekul biotin (Howarth *et al.*, 2006) sehingga intensitas warna sel positif akan menjadi lebih kuat. Adanya enzim HRP pada ikatan Ag-Ab kompleks menyebabkan terjadinya perubahan warna saat diberikan substrat. Substrat yang digunakan dalam metode ini adalah DAB sehingga sel positif terinfeksi virus akan terlihat coklat pada sitoplasmanya sementara yang negatif tidak ditemukan sel berwarna coklat (Gambar 1) Dalam penelitian ini dari kelompok yang diinfeksi, waktu kematian berkisar dari hari ke-3 sampai dengan hari ke-8 pascainokulasi, sementara dari kelompok kontrol tidak ditemukan kematian sampai akhir pengamatan pada hari ke-10. Antigen virus ND terlacak pada sampel organ dengan frekuensi bervariasi (Tabel 1) serta intensitas yang bervariasi pula (Gambar 1).

Hal ini mendukung sifat biologi dari isolat NDV virulen yakni menimbulkan infeksi

sistemik (Collins *et al.*, 1993; Yusoff dan Tan, 2001; de Leeuw *et al.*, 2003; Kattenbelt *et al.*, 2006). Intensitas sel yang positif sangat bervariasi tergantung dari jumlah virus yang ada di lokasi pengambilan sampel. Dalam penelitian ini intensitas sel positif tertinggi ditemukan pada makrofag dan sel-sel limfoid pada limpa, folikel bursa fabricius yang nekrotik (Gambar 1 f), bagian kelenjar dari lambung kelenjar (Gambar 1d), mukosa duodenum dan pada parenkim paru (Gambar 1 c). Sel positif juga ditemukan pada otot jantung (Gambar 1e), serta pada hepar, terutama di bagian parenkim yang nekrotik. Sampel organ paru, usus dua belas jari, lambung kelenjar, limpa dan bursa fabricius secara konsisten menunjukkan sel positif dengan intensitas bervariasi namun untuk otak besar sel positif hanya hanya ditemukan pada satu ayam yang mati di hari kedelapan. Di otak besar antigen virus ditemukan pada sel neuron yang degenerasi dan nekrosis (Gambar 1a). Walaupun secara alami virus ND virulen mampu menginfeksi dan berkembang biak pada semua sel pada ayam (Kattenbelt *et al.*, 2006; Wakamatsu *et al.*, 2006). Namun, dalam penelitian ini sel positif antigen tidak ditemukan pada semua sampel organ ayam yang diamati. Ada beberapa kemungkinan yang mengakibatkan tidak terlacaknya sel positif tersebut di antaranya adalah: kemungkinan jumlah virus yang ada pada organ tersebut masih rendah pada saat kematian ataupun jumlah virus pada potongan jaringan setebal 3-5 mikron belum cukup untuk menunjukkan reaksi dalam uji IHK ini, oleh karena itu untuk kepentingan diagnostik lebih baik berbagai sampel organ diperiksa dan pada masing masing organ diambil lebih dari satu lokasi.

SIMPULAN

Antibodi monoklonal ND yang diproduksi dalam penelitian ini dapat digunakan dalam metode IHK dan mampu mendeteksi antigen virus ND pada berbagai sampel organ ayam penderita penyakit ND. Jenis sampel organ sangat menentukan hasil pelacakan antigen. *Antigen positive cell* dengan intensitas tinggi selalu ditemukan pada organ limfoid (*bursa Fabricius* dan limpa), paru dan usus.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini sebagian didanai dari kerjasama dengan Laboratory of Global Animal Resource Science-University of Tokyo Jepang. Penulis mengucapkan terimakasih kepada Prof. Yoshihiro Hayashi selaku kepala laboratorium. Pemeliharaan ayam coba untuk infeksi buatan dilakukan di Balai Besar Veteriner(BBVet.) Denpasar, untuk itu penulis mengucapkan terimakasih kepada Bapak kepala balai yang telah mengizinkan menggunakan fasilitas hewan coba di instansi tsb. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada mahasiswa FKH Unud I Ketut Ngurah Wijana, Putu Eka Mariana Ratih dan I G N Agung Antaprapta yang terlibat dalam penelitian ini. Tidak lupa penulis juga sangat berterimakasih dan menghargai bantuan dari teknisi laboratorium Patologi FKH-Unud I Dewa Made Adi Witana.

DAFTAR PUSTAKA

- Adi AAAM. 2011. Biological and molecular studies on a pathogenic Newcastle disease virus isolated from a natural case in Indonesia.(Disertation) Tokyo:Tokyo University
- Alexander DJ. 2003. Newcastle Disease and other avian *Paramyxoviridae* infection. In: Saif YM, Barners HJ, Glisson JR, Fadly AM, Mc Dougald LR, Swayne DE(eds). *Diseases of Poultry* 11th edn. Ames Iowa State University Press. (pp 63 - 87).
- Collins M S, Bashiruddin JB, Alexander DJ. 1993. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease virus showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Arch Virol* **128**:363-370.
- de Leeuw O, Peeters B. 1999. Complete sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J Gen Virol* **80**:131-136.
- Howarth M, Chinnapen DJF, Gerrow K, Dorrestein PC, Grandy MR, Kelleher NL, Husseini E, Ting A, Alice Y. 2006. A monovalen streptavidin with a single femtomolar biotin binding site. *Nature Methods* **3** (4): 267–73.
- Jestin V, Jestin A. 1991. Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by invitro enzymatic amplification (PCR). *Arch Virol* **118**: 151-161.
- Kattenbelt JA, Stevens MP, Gould AR. 2006. Sequence variation in the Newcastle disease virus genome. *Virus Res* **116**:168–184.
- Kimbal W.2008. Monoclonal Antibody.<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/biology/pages/m/monoclonal.html>.
- Michelle JMS. 2006. Monoclonal antibody.<http://www.answers.com/topic/monoclonal-antibody>.
- Nagai Y. 1993. Protease-dependent virus tropism and pathogenicity. *Trends in Microbiol* **1**: 81-87.
- Naqi SA. 1990. A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. *Avian Dis* **34**: 893-898.
- Ohnishi K, Sakaguchi M, Kaji T, Akagawa K, Taniyama T, Kasai M, Yokota YT, Oshima M, Yamamoto K, Takasuka N, Hashimoto S, Ato M, Fujii H, Takahashi Y, Morikawa S, Ishii K, Sata T, Takagi H, Itamura S, Odagiri T, Miyamura T, Kurane I, Tashiro M, Kurata T, Yoshikura H, Takemori T. 2005. Immunological Detection of Severeacute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. *Jpn J Infect Dis* **58**: 88-94.
- Romer-Oberdorfer A, Werner O, Veits J, MebatsionT, Mettenleiter TC. 2003. Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. *J Gen Virol* **84**: 3121–3129.
- Yusoff K, Tan WS. 2001. Newcastle disease virus: Macromolecules and opportunities. *Avian Pathol* **30**:439-455
- Wakamatsu N, King DJ, Seal BS, Peeters BPH, Brown CC. 2006. The effect on pathogenesis of Newcastle disease virus La Sota strain from a mutation of the fusion cleavage site to a virulent sequence. *Avian Dis* **50**:483-488.