

Deteksi Resistensi Oseltamivir Influenza A (H1N1pdm09) dari Pasien Infeksi Saluran Pernafasan Akut Berat di Indonesia tahun 2014

Influenza A (H1N1pdm09) Oseltamivir Resistant Detection from Severe Acute Respiratory Infection (SARI) Patients in Indonesia in 2014

Vivi Setiawaty*, Hana Apsari Pawestri, Ni Ketut Susilarini

Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan,
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta, Indonesia

*E-mail: vivisetiawaty@hotmail.com

Diterima: 2 Desember, 2015

Revised: 24 Januari, 2016

Accepted: 23 Februari, 2016

Resistant

Abstrak

Virus influenza diklasifikasikan menjadi subtype berdasarkan dua antigen permukaan yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Perubahan antigenik dari virus influenza dapat menyebabkan resistensi obat antivirus yang jenisnya sangat terbatas. Resistensi terhadap obat yang dipakai saat ini adalah akibat adanya *antigenic drift* oleh mutasi titik (*point mutation*) pada satu asam amino pada posisi 275 (H275Y). Tujuan dari penelitian ini untuk mengidentifikasi adanya virus influenza A (H1N1pdm09) yang resisten terhadap oseltamivir dari kasus infeksi saluran pernafasan akut (ISPA) berat di Indonesia tahun 2014 dengan menggunakan metode uji deteksi cepat. Deteksi resistensi oseltamivir yang terdapat pada gen NA dilakukan dengan mengidentifikasi adanya *single nucleotide polymorphism* (SNP) pada posisi 275 (H275Y) menggunakan *realtime* RT-PCR dari spesimen klinis kasus ISPA. Sebanyak 870 spesimen dari 6 sentinel rumah sakit (RS) berhasil dikumpulkan dan 15 diantaranya positif H1N1pdm09. Dari ke 15 spesimen klinis tersebut tidak didapatkan adanya strain virus yang mengalami mutasi H275Y. Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa sepanjang tahun 2014 tidak ada virus influenza A (H1N1pdm09) yang resistensi terhadap oseltamivir dari spesimen kasus ISPA berat di 6 sentinel RS di Indonesia.

Kata kunci: Resistensi; Oseltamivir; ISPA berat; H1N1pdm09

Abstract

Influenza viruses are classified into subtypes based on two surface antigens known as hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). Antigenic changes of influenza virus can cause resistance to antiviral drugs which is already limited in variation. Resistance to the drugs used recently are due to antigenic drift by point mutation in a single amino acid at position 275 (H275Y). The purpose of this research is to identify the presence of influenza virus A (H1N1pdm09) that were resistant to oseltamivir from cases of severe acute respiratory infection (SARI) in Indonesia in 2014 by using a rapid detection test. Detection of oseltamivir resistance in NA gene is to identify the single nucleotide polymorphism (SNP) at position 275 (H275Y) using the real-time RT-PCR method from clinical specimens SARI case. A total of 870 specimens from six sentinel hospitals were collected and 15 of them positive H1N1pdm09. Of the 15 clinical specimens, H1N1pdm09 virus strains that have mutations H275Y were not found. Based on this finding, it can be concluded that during the year 2014, there is no influenza virus A (H1N1pdm09) resistant to oseltamivir from SARI cases specimen in six sentinel hospitals in Indonesia.

Keywords: Resistant; Oseltamivir; SARI; H1N1pdm09

PENDAHULUAN

Virus influenza A (H1N1pdm09) masih menyebabkan morbiditas dan mortalitas di seluruh dunia. Banyak kasus sudah terdeteksi terinfeksi virus ini.¹ Pada beberapa kasus yang terinfeksi virus Influenza A (H1N1pdm09) menunjukkan gejala infeksi yang berat, terutama pada kelompok risiko tinggi seperti wanita hamil, anak-anak dan kasus dengan obesitas.^{2,3,4} Beberapa negara telah memberlakukan pengobatan dengan pemberian oseltamivir pada kasus-kasus yang terinfeksi influenza A (H1N1pdm09) dengan berdasarkan cara kerja oseltamivir sebagai penghambat neuraminidase (NA).⁵

Virus Influenza mempunyai delapan segmen untai tunggal. Dua protein antigenik terletak pada permukaan virus yaitu Hemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA). Kedua protein ini menunjukkan variabilitas antigenik dan penentu utama patogenisitas.⁶ Sampai saat ini telah ditemukan delapan belas sub tipe HA (H1-H18), dan sebelas sub tipe NA (N1-N11).⁷ Ada dua jenis mekanisme kerja lini pertama obat antivirus influenza yang digunakan yaitu: penghambat neuraminidase (NA) seperti oseltamivir dan zanamivir) dan protein matriks 2 (M2) *ion channel blockers* misalnya amantadine dan rimantadine.⁸ Terbatasnya jenis obat antivirus menyebabkan perlunya monitoring adanya virus influenza yang resisten terhadap antivirus yang ada.

Dengan makin banyaknya penggunaan oseltamivir sebagai antivirus untuk pengobatan terhadap virus influenza, maka kemungkinan adanya strain virus influenza A (H1N1pdm09) yang resisten terhadap oseltamivir semakin menjadi perhatian bagi tenaga kesehatan di seluruh dunia.^{9,10} Sebagian besar strain virus influenza A (H1N1pdm09) yang resisten terhadap oseltamivir mengalami perubahan pada asam amino pada posisi 275 dimana protein *histidine* (H) berubah menjadi *tyrosine* (Y) dari gen NA. Perubahan ini memberikan arti yang sangat penting yaitu adanya penurunan kepekaan virus influenza A (H1N1pdm09)

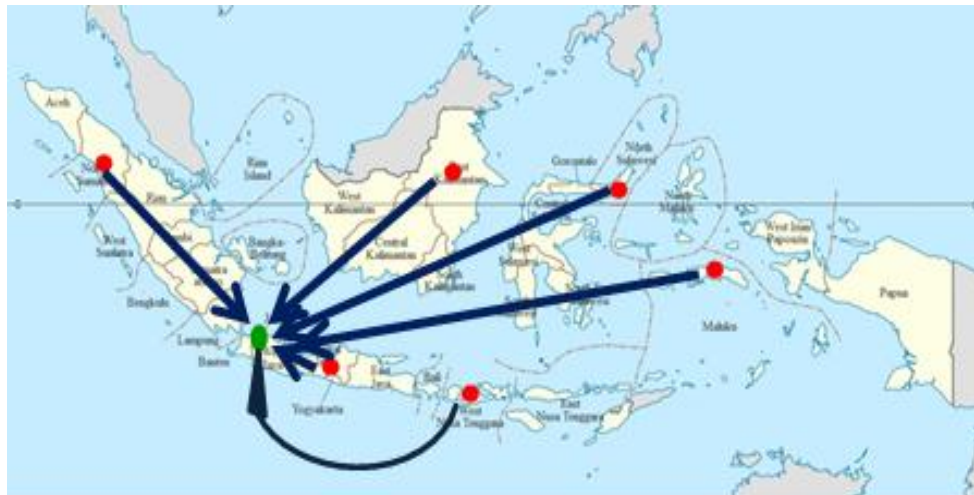
terhadap oseltamivir.¹¹

Beberapa negara telah melaporkan adanya mutasi H275Y pada gen NA dari virus influenza A (H1N1pdm09) yang menyebabkan virus resisten terhadap oseltamivir seperti negara-negara di Eropa, Brazil, Australia dan Thailand.¹¹⁻¹⁴ Sejak teridentifikasinya virus influenza A (H1N1pdm09) pada tahun 2009, virus ini terus bersirkulasi sampai saat ini berdasarkan data surveilans influenza di Indonesia. Penggunaan oseltamivir secara luas di Indonesia masih sangat terbatas. Walaupun demikian pemantauan adanya strain virus influenza A (H1N1pdm09) yang resisten terhadap oseltamivir tetap diperlukan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan identifikasi adanya virus influenza A (H1N1pdm09) yang resisten terhadap oseltamivir dari kasus-kasus infeksi saluran pernafasan akut (ISPA) berat di Indonesia tahun 2014 dengan menggunakan metode uji deteksi cepat.

METODE

Desain penelitian ini adalah potong lintang. Spesimen dikumpulkan sepanjang tahun 2014 melalui surveilans ISPA berat Indonesia di enam rumah sakit sentinel di 6 provinsi. Keenam rumah sakit tersebut adalah RS. Kanudjoso Djati Balikpapan, Kalimantan Timur; RSUD. Wonosari Daerah Istimewa Yogyakarta; RS. dr. M. Haulussy Ambon, Maluku; RSUD. Deli Serdang Medan, Sumatera Utara; RSUD Bitung, Sulawesi Utara; RSUP. Nusa Tenggara Barat (NTB), Nusa Tenggara Barat (Gambar 1). Spesimen berupa usapan tenggorok dan hidung yang dimasukkan ke dalam media transport virus (*Hanks Solution*) dan dikumpulkan dari kasus dengan ISPA berat sesuai kriteria inklusi dari WHO yaitu demam $\geq 38^{\circ}\text{C}$ dan batuk dengan onset demam tidak lebih dari 10 hari serta dirawat di rumah sakit. Adapun kriteria eksklusi adalah bila kasus tidak dapat diambil spesimennya karena menggunakan ventilator.¹⁵



Gambar 1. Peta lokasi RS sentinel surveilans ISPA berat dan alur pengiriman spesimen

Spesimen yang telah dikumpulkan dari tiap sentinel dikirimkan setiap minggu ke laboratorium virologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan untuk diperiksa tipe dan subtipe virus Influenza dengan metode *one-step realtime RT-PCR*.¹⁵ RNA virus diekstraksi dari spesimen klinis menggunakan MiniAmp Viral Isolation Kit (Qiagen, Germany) sesuai dengan instruksi pabrik. Prosedur ekstraksi RNA didasarkan pada metode spin kolom menggunakan sentrifus 8000 rpm selama 1 menit dan 14000 rpm selama 1 menit. Volume elusi akhir mengandung 60µl RNA virus dari masing-masing spesimen klinis. Untuk spesimen positif influenza A (H1N1pdm09) dilanjutkan pemeriksaan untuk mendeteksi resistensi oseltamivir dengan menggunakan analisis *single nucleotide polymorphism* (SNP) dengan metode *real-time RT PCR* untuk mengetahui adanya penanda mutasi resistensi oseltamivir pada posisi asam amino H275Y.

Real-time RT-PCR assay dilakukan dengan menggunakan Superscript III Platinum one step quantitative RT-PCR Kit (Invitrogen, USA). Lima mikroliter RNA ditambahkan dengan 10µl 2X reaksi mix, 0,4µl dari 10 pmol primer *forward & reverse*, 0,2µl dari 10 pmol masing-masing probe *wild type & mutan*, 0,4µl dari SSIII Platinum Taq, 3µl ROX, dan 0,4µl dari *nuclease free water*. Uji ini dilakukan pada mesin *real-time*

Thermal Cycler 7500 fast (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primer dan probe yang digunakan dalam pengujian ini dirancang oleh National Institute of Health, Thailand sebagai institusi rujukan penelitian Influenza (*Regional Influenza Reference Laboratory/RIRL*) di Asia Tenggara (data tidak dipublikasikan).

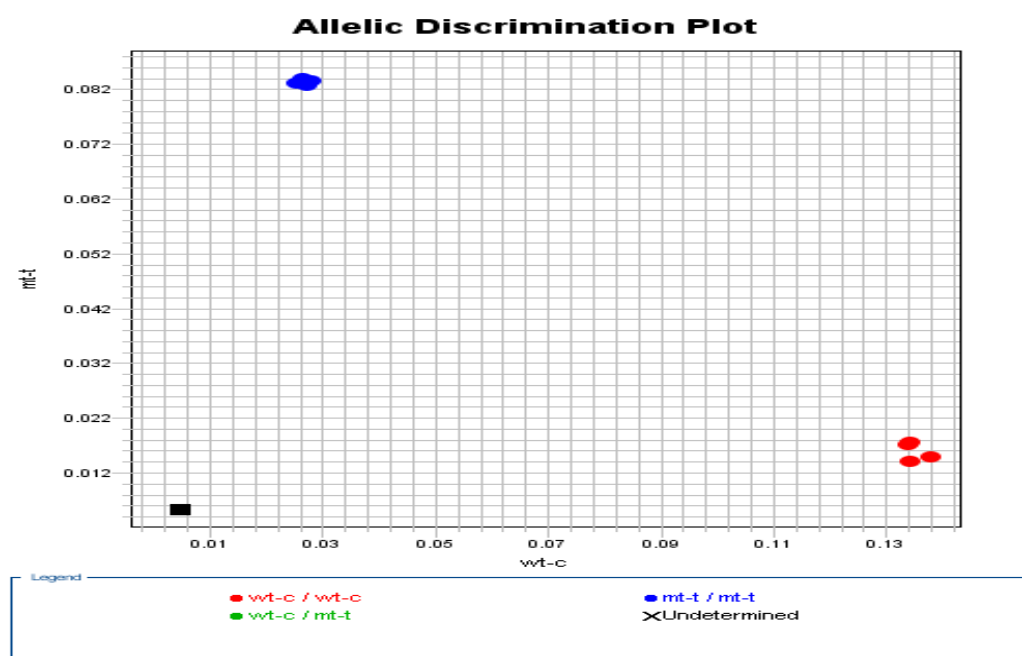
Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etik Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan dengan No. LB.02.01/5.2/KE.198/2014

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sejak 1 Januari sampai 31 Desember 2014, sebanyak 870 spesimen yang dapat diambil dari 944 kasus ISPA berat di 6 RS sentinel. Seluruh kasus menyatakan belum pernah minum antivirus (oseltamivir) dan selama dalam perawatan tidak pernah mendapat oseltamivir. Dari 870 spesimen di periksa dan diperoleh sebanyak 100 spesimen positif influenza, dan hanya 15 spesimen positif influenza yang merupakan influenza A (H1N1pdm09). Karakteristik responden dari 15 kasus dengan influenza A (H1N1pdm09) positif dapat dilihat pada tabel 1. Proporsi tertinggi kasus ISPA berat yang dirawat dan terinfeksi virus influenza adalah anak berusia 1-4 tahun. Adapun proporsi laki-laki dan wanita yang terinfeksi virus influenza tidak berbeda.

Tabel 1. Karakteristik Kasus ISPA berat

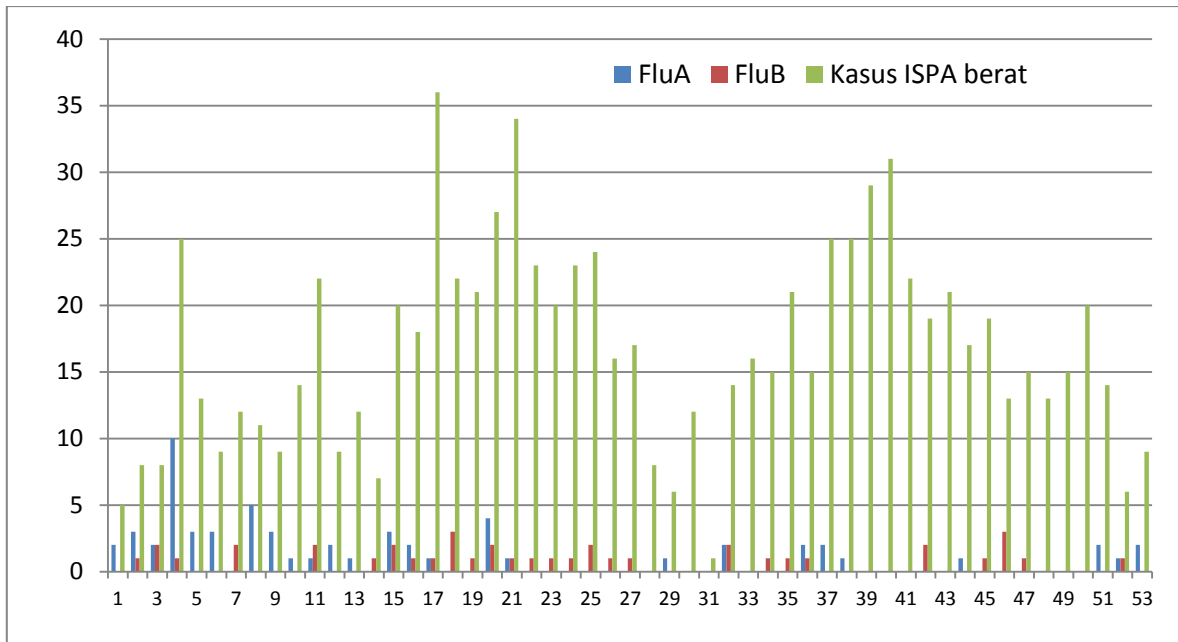
| | Positif Influenza (N=100) | Positif A (H1N1)pdm09 (N=15) |
|---------------------|---------------------------|------------------------------|
| | n (%) | n (%) |
| JenisKelamin | | |
| Laki-laki | 60 (60) | 8 (53) |
| Perempuan | 40 (40) | 7 (47) |
| KelompokUmur | | |
| < 1 tahun | 13 (13) | 2 (13) |
| 1 – 4 tahun | 38 (38) | 7 (47) |
| 5 – 14 tahun | 22 (22) | 1 (7) |
| 15 – 49 tahun | 11 (11) | 2 (13) |
| 50 – 64 tahun | 9 (9) | - |
| >65 tahun | 7 (7) | 3 (20) |



Gambar 2. Plot diskriminasi alel resistensi oseltamivir dengan *real time* RT-PCR

Dari gambar 2 dijelaskan bahwa kontrol dan sampel RNA alel H275-*wild type* akan sejajar dengan axis-X (warna merah), sedangkan kontrol 275Y-*mutant* akan sejajar dan berkumpul sepanjang garis axis-Y (warna biru). Kontrol negatif ditunjukkan dengan tanda kotak kecil (warna hitam) di bagian pojok kiri bawah axis X dan Y. Seluruh spesimen positif influenza A (H1N1pdm09), dilanjutkan pemeriksaannya untuk mengetahui adanya resistensi terhadap oseltamivir. Tidak ada satu pun dari 15

spesimen tersebut yang resisten terhadap oseltamivir. Hal ini terlihat dari hasil realtime RT-PCR yang menggunakan kontrol *wild type* virus (virus tanpa ada mutasi pada neuraminidase H275) dan mutan virus (virus yang mempunyai gen mutan Y275), dimana seluruh spesimen yang diperiksa mengelompok pada area *wild type* virus (Gambar 2). Pemeriksaan *realtime* RT-PCR dapat mendeteksi keberadaan gen mutan pada spesimen klinis.



Gambar 3. Pola sirkulasi virus influenza tahun 2014 di Indonesia,
Y aksis menunjukkan jumlah spesimen, X aksis menunjukkan minggu

Virus influenza A (H1N1pdm09) pertama kali bersirkulasi di dunia pada tahun 2009. Sejak 2009, virus ini bersirkulasi sepanjang tahun di dunia termasuk Indonesia. Di negara dengan empat musim sirkulasi virus influenza A (H1N1pdm09) meningkat pada musim dingin, sedangkan untuk negara tropis virus influenza A (H1N1pdm09) bersirkulasi sepanjang tahun.¹⁶ Berdasarkan pola sirkulasi virus influenza tahun 2014, peningkatan kasus terutama pada awal tahun dari minggu ke-1 sampai 19 dengan jumlah kasus tertinggi mencapai 36 kasus pada minggu ke-17. (Gambar 3).

Obat antivirus untuk pencegahan dan penatalaksanaan virus influenza telah dikenal sejak lama, yang diawali dengan obat generasi pertama yaitu amantadine (Symmetrel) dan rimantadin (Flumadine). Akan tetapi, kedua obat ini sudah tidak lagi efektif akibat banyaknya virus yang resisten terhadap obat tersebut. Obat generasi kedua, oseltamivir, saat ini merupakan satu-satunya obat dalam pengobatan influenza. Sayangnya beberapa strain virus influenza yang resisten terhadap oseltamivir telah ditemukan.¹⁷

Adanya strain virus yang resisten terhadap oseltamivir akan menyebabkan masalah yang serius apabila terjadi epidemi atau pandemi

influenza dan membutuhkan pengobatan dengan oseltamivir. Saat ini, standar baku emas untuk deteksi kesesuaian antivirus adalah metode fenotipik menggunakan uji penurunan aktivitas infeksi virus di sel yang disebut *neuraminidase inhibition assay* (NAI).¹¹ Metode NAI kurang dapat digunakan untuk pemantauan cepat adanya resistensi oseltamivir karena membutuhkan virus hidup. Metode deteksi genotipe dengan sekuensing gen NA dan *real-time RT-PCR* merupakan metode deteksi cepat yang dapat dilakukan untuk mendeteksi adanya mutasi asam amino H275Y langsung dari spesimen klinis yang terkait kuat dengan resistensi oseltamivir.¹⁸

Pemantauan secara cepat adanya virus influenza yang resisten terhadap golongan penghambat neuraminidase sangat perlu dilakukan. Deteksi langsung dari spesimen klinis mempersingkat waktu deteksi karena tidak perlu menunggu hasil kultur virus di sel (metode NAI) serta lebih murah dan lebih singkat dibandingkan dengan metode sekuensing dimana harus melalui proses RT-PCR selama 3 jam dan dilanjutkan dengan sekuensing selama 11 jam setelah spesimen di ekstraksi, sehingga cocok digunakan untuk pemantauan sirkulasi virus influenza secara rutin.¹⁹ Walaupun demikian masih terdapat

keterbatasan penggunaan metode molekuler ini, dimana jumlah RNA virus pada spesimen klinis sangat bervariasi, kadang sangat rendah sehingga tidak dapat dideteksi.²⁰

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pemantauan virus influenza A (H1N1pdm09) yang bersirkulasi pada tahun 2014 di 6 sentinel RS, tidak ditemukan adanya strain virus yang resisten terhadap antivirus oseltamivir.

SARAN

Mengingat pentingnya antivirus khususnya oseltamivir untuk penanganan kasus ISPA berat, selanjutnya diperlukan pemantauan resistensi terhadap virus influenza yang berkelanjutan setiap tahun.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas segala dukungan dan bantuan tim surveilans ISPA berat baik dari RS sentinel (RS. Kanudjoso Djati, RS. dr. M. Haulussy, RS. Wonosari, RSUP. NTB, RS. Deli Serdang, RS. Bitung), Subdit ISPA Direktorat Penyakit Menular, Ditjen P2PL dan laboratorium virologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang telah bekerjasama melaksanakan surveilans influenza ini. Terima kasih kami ucapkan kepada responden di seluruh RS sentinel yang telah berpartisipasi dalam penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

1. Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, et al. Emergence of the a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* 2009;360:2605-15.
2. Jamieson DJ, Honein MA, Rasmussen SA, Williams JL, Swerdlow DL, Biggerstaff MS, et al. H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA. *Lancet.* 2009;374:451-8.
3. Sachedina N, Donaldson LJ. Paediatric mortality related to pandemic influenza A H1N1 infection in England: an observational population-based study. *Lancet.* 2010;376:1846-52.
4. Morgan OW, Bramley A, Fowlkes A, Freedman DS, Taylor TH, Gargiullo P, et al. Morbid obesity as a risk factor for the hospitalization and death due to 2009 pandemic influenza A (H1N1) disease. *PLoS One.* 2010;5:e9694.
5. Hersh AL, Stafford RS. Antiviral prescribing by office-based physicians during the 2009 H1N1 pandemic. *Ann. Intern. Med.* 2011;154:74-6.
6. Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al., Eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001; pp. 1487-531.
7. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 2013; 9(10): e1003657.
8. Layne SP, Beugelsdijk TJ, Patel CK, Taubenberger JK, Cox NJ, et al. A global lab against influenza. *Science.* 2001;293: 1729. doi: 10.1126/science.293.5536.1729.
9. Leung TW, Tai AL, Cheng PK, Kong MS, Lim W. Detection of an oseltamivir-resistant pandemic influenza A/H1N1 virus in Hong Kong. *J. Clin. Virol.* 2009;46:298-9.
10. Le QM, Warheim HF, Tran ND, van Doorn HR, Nguyen TH, Horby P. A community cluster of oseltamivir-resistant cases of 2009 H1N1 influenza. *N. Engl. J. Med.* 2010;362:86-7.
11. Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, Lina B, van-der-Werf S, Schweiger B, et al. Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007-08 season. *Emerg Infect Dis.* 2009;15: 552-60. doi: 10.3201/eid1504.181280.
12. Santos KCO, Silva DBB, Benega MA, Paulino RS, E Silva Jr ER, Pereira DS, et al. Influenza virus surveillance by the Instituto Adolfo Lutz, Influenza season 2014: antiviral resistance. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2015;57(1):92. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000100016>.
13. Hurt AC, Hardie K, Wilson NJ, Deng YM, Osbourn M, Leang SK, et al. Characteristics of a wide spread community cluster of H275Y oseltamivir-resistant A(H1N1) pdm09 Influenza in Australia. *Journal of Infectious Diseases.* 2012;206:148-57.
14. Payungporn S, Poomipak W, Makkoch J, Rianthavorn P, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Detection of oseltamivir sensitive/resistant strains of pandemic

- influenza A virus (H1N1) from patients admitted to hospitals in Thailand. *J Virol Methods*. 2011;177(2):133-9. doi:10.1016/j.jviro.2011.07.008.
15. World Health Organization, Global epidemiological surveillance standards for influenza, Geneva. January 2014.
 16. Saha S, Chadha M, Al Mamun A, Rahman M, Sturm-Ramirez K, Chittaganpitch M, et al. Influenza seasonality and vaccination timing in tropical and subtropical areas of southern and south-eastern Asia. *Bulletin of the World Health Organization*. 2014;92:318-30. doi:http://dx.doi.org/10.2471/BLT.13.124412.
 17. Marx C, Gregianini TS, Lehmann FK, Lunge VR, Carli SD, Dambrós BP, *et al.* Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) pdm09 virus in southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108:392-4.
 18. Nidzworsky D, Dobkowska J, Hofysz M, Gromadzka B, Szewczyk B. A multiplex real-time PCR assay for detection of oseltamivir-resistant strains of influenza virus. *Cent. Eur. J. Biol*. 2014;9(6):628-33. DOI: 10.2478/s11535-014-0296-z.
 19. Butler J, Hooper KA, Petrie S, Lee R, Maurer-Stroh S, Reh L, et al. Estimating the fitness advantage conferred by permissive neuraminidase mutations in recent oseltamivir-resistant A (H1N1) pdm09 influenza viruses. *PLOS Pathog*. 2014;10(4):e1004065.
 20. Renaud C, Kuypers J, Corey L. Diagnostic accuracy of an allele-specific reverse transcriptase-PCR assay targeting the H275Y oseltamivir resistant mutation in 2009 pandemic influenza A/H1N1 virus. *J Clin Virol*. 2010;49:21-5.