

Patologi Komparatif Itik dan Ayam yang Diinfeksi Buatan dengan Virus HPAI H5N1-Clade 2.3.2

(Comparative pathology of ducks and chickens experimentally infected with HPAI H5N1-Clade 2.3.2 viruses)

Damayanti R, Indriani R, Nuradji H

*Balai Besar Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114
agusrini@indo.net.id*

ABSTRACT

The outbreaks of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAI) are still present in Indonesia. The aim of this study was to compare the pathology changes observed in HPAI H5N1 infected ducks and chickens. Nine healthy chickens and nine ducks were experimentally infected with HPAI H5N1 virus clade 2.3.2. (A/duck/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012). Clinical signs and mortality were recorded. Several organs were collected from dead birds and clinicopathological findings were observed. Immunohistochemical staining was performed to detect the distribution of the antigen in affected tissues. Results showed that both ducks and chickens were susceptible to HPAI H5N1 clade 2.3.2. infection indicating by mortality found in these birds. Pathological lesions varied in severity and the chickens and ducks had certain predilection tissues which were positively correlated with the level of antigen detected in the associated organs. Histopathologically, the lesions in the form of encephalitis, sinusitis, tracheitis, pneumonia, dermatitis in chickens were of less severe than similar lesions in ducks. Conjunctivitis and pancreatitis were only found in ducks infected with clade 2.3 H5N1. Ducks have a greater predilection for nasal organs, orbitals (eyes), hair follicles and pancreas, while in chickens the predilection is in the proventricular organs, liver, spleen, intestines and bursa of fabrisius.

Key words: Chicken, duck, histopathology, HPAI H5N1 clade 2.3.2., immunohistochemistry

ABSTRAK

Wabah virus Avian Influenza yang sangat patogen H5N1 (HPAI) masih terdapat di Indonesia. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan perubahan patologi yang diamati pada itik dan ayam yang diinfeksi HPAI H5N1 clade 2.3.2. Sembilan ekor ayam sehat dan sembilan itik secara eksperimental diinfeksi virus HPAI H5N1 clade 2.3.2. (A/bebek/Sukoharjo/BBVW-1428-9/2012). Tanda-tanda klinis dan mortalitas dicatat, sejumlah organ dikoleksi untuk diproses sebagai preparat histopatologi. Pewarnaan imunohistokimia dilakukan untuk mendeteksi distribusi antigen dalam jaringan yang terserang dan untuk mengetahui patogenesis penyakitnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa baik itik maupun ayam rentan

terhadap infeksi HPAI H5N1 clade 2.3.2. yang ditunjukkan oleh kematian yang ditemukan pada unggas ini. Lesi patologis bervariasi derajat keparahannya dan ayam dan itik masing-masing mempunyai predileksi terhadap organ organ tertentu yang berkorelasi positif dengan level antigen yang dideteksi pada organ terkait. Secara histopatologis lesi yang berupa ensefalitis, sinusitis, trakheitis, pneumonia, dermatitis pada ayam derajat keparahannya lebih ringan daripada lesi serupa pada itik. Konjungtivitis dan pankreatitis hanya ditemukan pada itik yang diinfeksi H5N1 *clade* 2.3. Itik mempunyai predileksi lebih besar terhadap organ nasal, orbital (mata), folikel bulu dan pankreas, sedangkan pada ayam predileksinya ada pada organ proventrikulus, hati, limpa, usus dan bursa fabrisius.

Kata kunci: Ayam, itik, histopatologi, HPAI H5N1 clade 2.3.2, imunohistokimia

PENDAHULUAN

Pada akhir tahun 2003 dan awal 2004 telah terjadi wabah penyakit yang disebabkan oleh virus *highly pathogenic avian influenza* (HPAI) H5N1 pada unggas di Cina dan beberapa negara di Asia Tenggara. Virus tersebut juga bersifat fatal pada manusia dan ternyata setelah diteliti dapat dibuktikan bahwa terdapat serangkaian *genetic reassortment* yang merupakan prekursor terhadap virus H5N1 yang menyebabkan wabah pada manusia di Hong Kong pada tahun 1997 (Li et al. 2004). Semenjak itu virus tersebut telah menyebar ke lebih dari 60 negara di Asia, Eropa, dan Afrika dan telah menyerang unggas liar dan ternak unggas di mana penyakit bersifat sporadik dan bahkan menular ke manusia, sehingga menjadi pandemik (Peiris et al. 2007). Di Indonesia, pada bulan September-November 2012 terjadi kematian tinggi pada itik di daerah Jawa Tengah, Jawa Timur, dan DI Yogyakarta dan virus AI subtipe H5N1 clade 2.3.2 berhasil diidentifikasi sebagai virus penyebabnya (Wibawa et al. 2012).

Studi filogenetik menyebutkan bahwa virus clade 2.3.2 telah ditularkan oleh burung liar yang bermigrasi sampai ke Myanmar, Bangladesh, dan India (Nagarajan et al. 2012). Sejalan dengan fenomena tersebut di Indonesia sejak September 2012 terdapat banyak kematian pada itik oleh virus H5N1 yang disebabkan oleh virus AI clade 2.3.2 yang diduga berasal dari luar negeri, seperti Vietnam, Bulgaria, China, India, Hongkong (Brojer et al. 2015), Jepang, Korea, Laos, Nepal, Bangladesh, Mongolia (Marinova-petkova et al. 2012), dan Eropa (Reid et al. 2013), sehingga kemungkinan besar virus ini bukan merupakan hasil mutasi clade sebelumnya, yaitu 2.1 (Dharmayanti & Indriani 2015).

Selain itu, virus HPAI H5N1 masih terus mengancam unggas di beberapa wilayah di dunia dan itik dikenal berperan penting untuk penyebaran penyakit. Unggas liar termasuk itik merupakan induk semang penting bagi keberlangsungan penularan HPAI H5N1 karena pada itik virus H5N1 bersifat persisten bahkan setelah terbentuknya imunitas humoral, mekanisme evolusi ini penting untuk selalu dipertimbangkan pada wabah HPAI H5N1 di Indonesia

(Wibawa et al. 2014) karena berkaitan dengan pemilihan jenis vaksin yang sesuai (Indriani & Dharmayanti 2014).

Derajat keparahan penyakit pada infeksi HPAI H5N1 ditentukan oleh *intravenous pathogenicity index test* (IVPI) yang merupakan standar internasional untuk mengetahui tingkat keganasan virus, HPAI H5N1, dan index tersebut pada ayam sangat tinggi artinya H5N1 bersifat letal untuk ayam tetapi untuk ternak itik virus H5N1 memproduksi manifestasi klinis dan histopatologi sangat beragam (Pantin-Jackwood & Swayne 2009). Bahkan yang perlu diwaspadai, baik itik yang menunjukkan gejala klinis maupun yang asimtomatik keduanya berpotensi menularkan ke unggas lain dan menimbulkan wabah pada ayam komersial dan mengancam kesehatan manusia pula (Keawcharoen et al. 2008). Sampai dengan tahun 2002, virus HPAI H5N1 hanya menimbulkan gejala klinis ringan bahkan asimptomatis pada itik tapi setelahnya banyak menunjukkan keparahan pada itik (Pantin-Jackwood & Swayne 2009). Namun patogenitasnya tergantung pada strain, umur dan spesies itik dan juga itik dinyatakan sangat rentan terhadap HPAI H5N1 melalui berbagai rute infeksi (Pantin-Jackwood et al. 2013). Temuan tersebut sangat penting untuk memahami bagaimana HPAI H5N1 menular di antara ternak itik dan pada spesies unggas lainnya (Pantin-Jackwood et al. 2013).

Studi komparatif patologi dan imunohistokimia telah dilakukan di Mesir terhadap virulensi virus H5N1 clade 2.3.2 yang menyerang ayam dan itik menunjukkan bahwa lesi spesifik HPAI yang disebabkan oleh clade 2.3.2 tetap se ganas clade sebelumnya, 2.1.3 (Abou-Rawash et al. 2012). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan lesi histopatologi dan deteksi antigen virus H5N1 clade 2.3.2 isolat lokal pada itik dan ayam SPF, sehingga patogenitas isolat terhadap organ visceral kedua unggas tersebut dapat diketahui.

MATERI DAN METODE

Inokulum dan vaksin

Dalam penelitian ini digunakan virusantang berasal dari isolat lapang virus AI H5N1 A/Duck/Sukoharjo/Bbvw-1428-9/2012 yang tergolong pada clade 2.3.2 (Balai Besar Veteriner, Wates-Jogjakarta) yang diolasi dari itik di Jawa Tengah, Indonesia (Wibawa et al. 2012). Vaksin yang dipakai berupa vaksin inaktif AI subtipe H5N1 yang berisikan seed vaksin A/ck/wj/Pwt-Wij/2006 clade 2.1.3 isolat lokal (Dirjen PKH 2013). Vaksin tersebut merupakan vaksin komersial yang beredar di pasaran (vaksin A).

Hewan coba ayam Specific Pathogen Free (SPF)

Sebelum diinfeksi ayam diuji serologis dengan uji Hemagglutinine Inhibition (HI) dan semua dinyatakan negatif. Selain itu *swab* dinyatakan negatif terhadap

virus AI melalui virus isolasi pada telur embrio tertunas. Ini menunjukkan bahwa ayam bersih dari infeksi H5N1.

Dalam penelitian ini digunakan 9 ekor ayam umur 30 hari, yang ditetaskan dari telur ayam SPF (PT Vaksindo) dengan menggunakan inkubator Brinsea di laboratorium BSL-3, Balai Besar Penelitian Veteriner (BB Litvet). Ayam SPF dipelihara di dalam kandang isolator Allentown di laboratorium BSL-3. Ayam SPF diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Ayam SPF umur 30 hari dikelompokkan menjadi 2, kelompok pertama terdiri dari 7 ekor yang tidak diberi vaksin dan dua ekor yang diberi satu dosis (sesuai saran pabrik) vaksin AI H5N1 clade 2.1.3 (vaksin A). Selanjutnya ayam dari kedua kelompok diinfeksi virus HPAI subtype H5N1 clade 2.3.2 dengan kandungan 106 *embryo infectious dose* (EID) 50 per 0,1 ml/ekor secara intra-nasal (Swayne 2007). Gejala klinis dan mortalitas diamati setiap hari dari umur 1-14 hari atau sampai hewan ditemukan mati.

Hewan coba itik

Sebelum diinfeksi itik diuji dengan Hemagglutinine Inhibition (HI) dan semua dinyatakan negatif. Selain itu *swab* dinyatakan negatif terhadap virus AI melalui virus isolasi pada telur embrio tertunas dan semua itik bersih dari infeksi H5N1.

Pada penelitian ini digunakan 9 ekor itik Mojosari yang berumur 30 hari diperoleh dari peternakan itik di Jawa Barat, itik tersebut dipelihara di dalam kandang isolator Allentown di laboratorium BSL-3, diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Terdapat 2 kelompok perlakuan, yaitu kelompok tidak divaksinasi sebanyak 7 ekor dan kelompok kontrol yang divaksinasi dengan satu dosis (sesuai saran produsen) vaksin AI H5N1 clade 2.1.3 sebanyak 2 ekor. Itik dari setiap kelompok ditantang dengan virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) H5N1 clade 2.3.2 dengan titer virus 106 EID₅₀ per 0,1 ml/ekor (Swayne 2007) secara intra nasal di dalam kandang isolator BSL-3 Modular, Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor. Hewan coba diamati gejala klinis dan mortalitas yang terjadi dicatat setiap hari.

Sampel untuk histopatologi

Ayam dan itik yang mati atau sekarat dinekropsi dengan kode etik sesuai standar kesejahteraan hewan. Berbagai organ viseral dikoleksi untuk pewarnaan Hematoxillin dan Eosin (H&E) menurut Feldman & Wolfe (2014). Lesi dikategorikan secara diskriptif sebagai tidak ada kelainan spesifik (TKS) atau lesi ringan, sedang, dan berat dan masing masing ditandai sebagai +, ++, dan +++.

Pewarnaan imunohistokimia

Pewarnaan imunohistokimia dilakukan sesuai dengan metode sebelumnya untuk mendeteksi antigen virus pada preparat histopatologi (Damayanti et al. 2017). Secara singkat, pada slide ditambahkan dengan antibodi primer, hidrogen peroksida 3%, antibodi sekunder yang sudah dilabel dengan biotin (DAKO, Denmark) dan avidin biotin peroxidase (DAKO). Substrat yang dipilih untuk memvisualisasikan antigen, yaitu 3-3-di-amino benzidine (DAB) (DAKO, Denmark). Sampel ditetapkan sebagai positif jika antigen virus terdeteksi berwarna coklat menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10x20; Skor tersebut diklasifikasikan sebagai - (negatif) jika tidak ada antigen sama sekali, + (sedikit) jika jumlah sel berantigen 1-5 sel, ++ (sedang) jika terdapat 6-10 sel berantigen, dan banyak (+++) jika jumlah terdapat lebih dari 10 berantigen dalam satu lapang pandang mikroskop.

Analisa data

Data yang diperoleh dari derajat keparahan lesi histopatologi dan sebaran antigen pada jaringan secara imunohistokimia dianalisa secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gejala klinis yang tampak pada ayam yang diinfeksi berupa depresi, bulu kusut, tidak nafsu makan, diikuti dengan bintik-bintik perdarahan pada subkutan kulit pada kaki, sianosis, dan odema pada jengger dan pial. Beberapa ekor ayam menunjukkan gejala syaraf (sempoyongan, tremor, ataxia), berbaring, dan depresi. Ayam SPF menampakkan gejala klinis 24-48 jam pasca infeksi dan ditemukan mati pada hari ke-3. Pada itik ditemukan gejala klinis berupa bulu kusut, sinusitis, kekeruhan kornea mata, diare, dan kematian terjadi pada hari ke-6 pasca infeksi. Gejala klinis pada ayam dan itik muncul dengan manifestasi berbeda dan ayam lebih cepat mati daripada itik dengan tingkat kematian mencapai 100% (Nuradji et al. 2015). Hal ini menunjukkan bahwa clade 2.3.2 lebih patogen pada ayam (Damayanti et al. 2017). Hal ini tergantung pada perbedaan respons terhadap infeksi (Cagle et al. 2011). Gejala klinis ini sebagian besar seperti yang dilaporkan pada kejadian infeksi H5N1 pada ayam dan itik di Mesir (Abou-Rawash et al. 2012) dan di Indonesia (Nuradji et al. 2015).

Lesi pascamati yang diamati terutama ditandai oleh kulit dan jaringan subkutan terdapat perdarahan, pembendungan darah (kongesti) pada otak, paru, dan ginjal disertai perdarahan fokal pada trakhea. Lesi tersebut menunjukkan adanya disfungsi sel endotel pembuluh darah dan monosit/makrofag atas infeksi virus HPAI yang dapat menyebabkan gangguan hemostasis yang diwakili oleh koagulasi darah yang berlebihan dan koagulopati (Muramoto et al. 2006). Selain

itu perdarahan yang ditemukan pada ayam dan itik yang diinfeksi HPAI H5N1 clade 2.3.2 ini melibatkan endotel vaskular yang dianggap sebagai salah satu target utama untuk virus HPAI pada ayam, sehingga disfungsi endotel oleh infeksi virus menyebabkan perdarahan sistemik pada ayam (Abou-Rawash et al. 2012). Sementara itu dilaporkan bahwa pada itik yang terinfeksi secara alami, lesi yang paling konsisten adalah perdarahan berupa *petechiae* (bintik-bintik perdarahan pada mukosa), nekrosis hemoragik multifokal pada pankreas, odema paru, dan pembendungan pada otot dan otak dan pendarahan pada meningen (Abou-Rawash et al. 2012).

Histopatologi dan imunohistokimia

Tabel 1 menunjukkan derajat keparahan lesi pada organ viseral dari ayam dan itik yang terinfeksi virus H5N1 clade 2.3.2. Seperti kita lihat pada Tabel 1, ayam dan itik yang divaksinasi tetap mempunyai kelainan histopatologi karena virus H5N1 clade 2.3.2 sangat virulen dan vaksin yang berasal dari clade 2.1.3 tidak cukup protektif melawan infeksi. Swayne et al. (2015) menyebutkan bahwa kualitas vaksin, pemilihan strain benih, dan kandungan antigen, serta masalah aplikasi di lapangan dapat menyebabkan kegagalan vaksin.

Secara histopatologis lesi yang berupa ensefalitis, sinusitis, trakheitis, pneumonia, dermatitis pada ayam derajat keparahannya lebih ringan daripada lesi serupa pada itik. Pada penelitian pada ayam kampung yang diinfeksi virus H5N1 dengan cara kontak dengan itik yang terinfeksi H5N1 terlebih dulu ternyata ayam mati lebih cepat dibandingkan dengan itik yang sudah terinfeksi sebelumnya. Artinya, virus HPAI H5N1 clade 2.3.2 asal Indonesia lebih patogen pada ayam dibandingkan dengan pada itik (Damayanti et al. 2017). Sedangkan pada organ mata dan pankreas, tidak ditemukan lesi pada ayam yang terinfeksi H5N1 clade 2.3.2 sementara pada itik ditemukan konjungtivitis ringan, sedang, dan parah dan pankreatitis disertai nekrosis dengan derajat parah. Lesi pada itik juga dilaporkan pada area nasal dan mata karena organ tersebut merupakan *tissue tropism* dari virus H5N1 clade 2.3.2 (Brojer et al. 2015). Bursitis nonsupuratif ditemukan pada ayam dengan derajat ringan, sedang sampai parah, sedangkan pada itik bursa sudah mengalami atropi, sehingga tidak dapat dilakukan *sampling*.

Tabel 1. Derajat keparahan lesi pada berbagai organ ayam kampung dan itik yang diinfeksi isolat H5N1 clade 2.3.2

Kode	Otak	Nasal	Trakhea	Folikel bulu	Jantung	Paru	Proven-trikulus	Hati	Limpa	Usus	Pankreas	Ginjal	Bursa	Mata
Ch 1	+	+	+	+	-	++	+++	++	++	++	-	++	++	-
Ch 2	++	+	-	+	-	-	++	++	+++	++	-	+	-	-
Ch 3	+	+	-	+	++	++	+++	-	-	+++	-	++	-	-
Ch 4	+	+	+	+	++	++	-	++	++	-	-	+	+++	-
Ch 5	++	+	-	+	++	-	++	-	-	+++	-	+	+++	-
Ch 6	++	++	-	++	+	++	+	-	-	+++	-	-	+++	-
Ch 7	+	+	+	+	+	++	+++	-	++	-	-	-	++	-
Ch 8 Vac A	-	-	+	-	-	++	++	+	+	-	-	++	++	-
Ch 9 Vac A	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	-	++	-	-
D1	++	+++	++	+	-	-	++	+++	++	-	-	++	TA	++
D2	++	+++	-	+++	-	++	-	++	-	++	+++	++	TA	+
D3	+++	+	-	+	-	++	++	-	-	+++	+++	++	TA	+
D4	++	+	++	+++	-	+++	++	++	-	-	+++	++	TA	++
D5	++	+++	++	++	-	-	-	++	-	+++	-	+	TA	+++
D6	+++	+++	++	+	++	++	-	-	-	-	+++	++	TA	+
D7	+	++	-	+	-	-	-	-	-	++	-	-	TA	+
D8 Vac A	-	-	-	+++	-	++	-	++	-	-	+++	+	TA	-
D9 Vac A	++	-	++	-	+++	+++	-	+	++	++	-	-	TA	-

-: tidak ada lesi khas, +: lesi ringan, ++: lesi sedang, +++: lesi parah. TA: tidak ada sampel

Tabel 2. Jumlah sebaran antigen pada berbagai organ ayam kampung dan itik dengan pewarnaan imunohistokimia

Kode	Otak	Nasal	Trakhea	Folikel bulu	Jantung	Paru	Proventrikulus	Hati	Limpa	Usus	Pankreas	Ginjal	Bursa	Mata
Ch 1	+++	+	++	+	-	+++	+++	++	+++	-	-	+++	+++	-
Ch 2	+++	+	-	+	+++	+++	+++	++	+++	-	+++	-	-	-
Ch 3	+++	+	-	+	-	+++	++	-	++	-	-	+++	-	-
Ch 4	+++	+	++	+	+++	++	+++	++	+++	+++	-	++	+++	-
Ch 5	+++	+	+	+	+++	+++	+++	++	+++	+	-	+++	+++	-
Ch 6	+++	++	++	++	+++	+++	+	++	+++	++	-	-	+++	-
Ch 7	+++	+	-	+	+++	+++	+++	++	+++	++	-	-	+++	-
Ch 8 Vac A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ch 9 Vac A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-
D1	+++	+++	+++	++	+++	-	+	-	-	-	-	+++	-	++
D2	+++	+++	+	+++	+++	+	-	-	-	++	+++	+	-	+
D3	+++	+	-	+	-	++	-	+++	-	++	+++	++	-	+
D4	++	+	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
D5	+++	++	++	++	+++	-	-	++	-	+	+++	+	-	+++
D6	+++	++	++	+	+++	-	-	-	-	-	+++	-	-	+
D7	+++	+++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D8, Vac A	+++	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
D9, Vac A	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

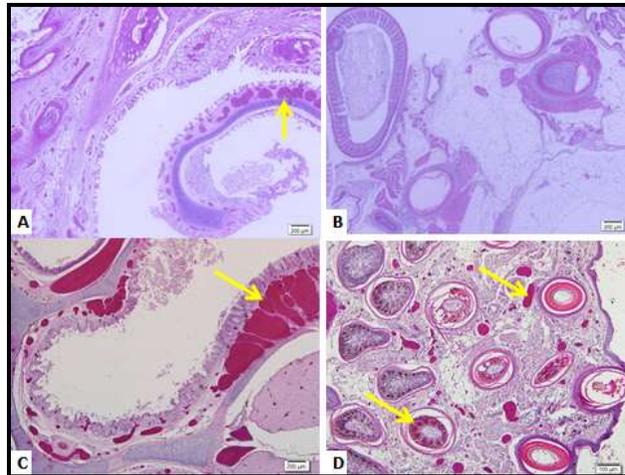
-: tdk ada antigen, +: rendah (1-5 antigen/lapang), ++: sedang (6-10 antigens/ lapang), +++: tinggi (lebih dari 10 antigens/ lapang)

Pada Gambar 1 tampak potongan melintang rongga hidung dan folikel bulu ayam dan itik yang terinfeksi H5N1 clade 2.3.2 di mana terdapat odema ringan dan hemoragi pada ayam sedangkan pada itik lesi tersebut lebih parah. Hal ini menandakan bahwa itik lebih peka terhadap gangguan vaskular, seperti dilaporkan oleh Abou-Rawash et al. (2012) yang menyebutkan bahwa dinding pembuluh darah merupakan tissue tropism (organ target) untuk HPAI. Selain itu patogenesis infeksi virus HPAI H5N1 pada ayam dan itik menunjukkan perbedaan respons gen inang terhadap infeksi (Kuchipudi et al. 2014)

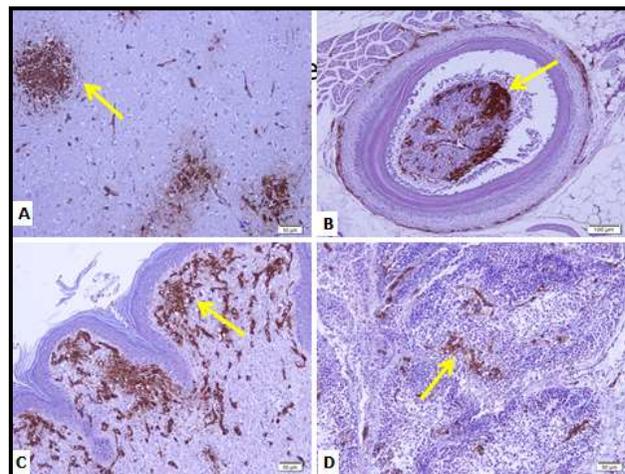
Perlu dicatat bahwa pada ayam tidak dijumpai lesi pada area orbital (mata), sedangkan pada itik ditemukan konjungtivitis non supuratif dengan derajat keparahan ringan, sedang sampai parah. Lesi serupa pada mata dan rongga hidung juga dilaporkan pada itik yang terinfeksi virus H5N1 clade 2.3.2 hal ini disebabkan virus memiliki tissue tropism pada area nasal dan mata (Brojer et al. 2015).

Tabel 2 memperlihatkan deteksi antigen pada berbagai organ viseral pada ayam dengan pewarnaan imunohistokimia (IHK). Pada ayam dan itik antigen dapat dideteksi dalam jumlah sangat tinggi pada otak, jantung, dan ginjal. Pada ayam antigen hanya ditemukan dalam level rendah pada area nasal dan folikel bulu sementara pada itik jumlahnya ada pada derajat sedang sampai tinggi. Pada ayam antigen tidak terdeteksi samasekali pada organ mata dan pada pankreas antigen hanya ditemukan dengan derajat sedang pada satu ekor ayam, sementara pada itik area orbital dan pankreas merupakan area dengan jumlah antigen cukup signifikan. Ini artinya HPAI H5N1 clade 2.3.2 pada itik mempunyai predileksi kuat pada organ nasal, orbital (mata), folikel bulu, dan pankreas. Lesi yang ditemukan pada penelitian ini serupa dengan lesi histopatologis yang ditemukan pada ayam kampung yang terinfeksi HPAI H5N1 clade 2.3.2 dengan lesi ensefalitis, trakheitis, miokarditis, pneumonia interstitialis, hepatitis, proventrikulitis, enteritis, pankreatitis, nefritis, dan bursitis yang kesemuanya bersifat peradangan non-supuratif, disertai dengan nekrosis pada limpa dan pankreas (Damayanti et al. 2017). Pada organ proventrikulus, hati, limpa, dan usus dan bursa fabrisius antigen lebih banyak terdeteksi pada ayam daripada pada itik. Hal ini seperti dilaporkan oleh Muramoto et al. (2006) yang menyatakan bahwa pada ayam, virus terdeteksi dalam sel endotel pada 18 dan 24 jam pascainfeksi dan antigen virus terdeteksi dalam sel parenkim otak, jengger, paru, dan jantung.

Gambar 2 memperlihatkan distribusi antigen pada ayam, yaitu pada organ otak, folikel bulu, endodermis jengger, dan bursa fabricius dengan level cukup tinggi pada otak dan endodermis jengger dan level sedang pada folikel bulu dan bursa fabricius. Gambar 3 menunjukkan distribusi antigen pada itik, yaitu pada organ otak, folikel bulu (lebih banyak jumlahnya daripada yang terdeteksi pada ayam) serta pada konjungtiva mata (tidak terdeteksi pada ayam), dan pankreas. Lesi serupa juga dilaporkan di mana pada itik lesi pada area nasal dan mata,



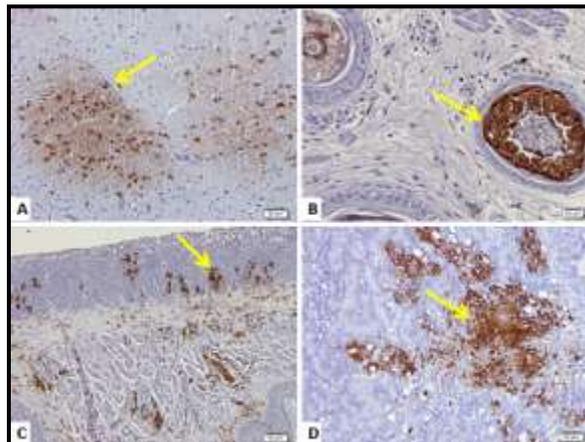
Gambar 1. Ayam dan itik yang terinfeksi H5N1 clade 2.3.2: oedema ringan dan hemoragi pada nasal ayam (A) dan folikel bulu ayam (B), odema sedang dan hemoragi parah pada nasal itik (C) dan folikel bulu itik (D). Pewarnaan H & E



Gambar 2. Distribusi antigen pada organ ayam: otak (A), folikel bulu (B), endodermis jengger (C) dan bursa fabricius (D). Pewarnaan IHK, substrat DAB

merupakan *tissue tropism* yang tidak dijumpai pada ayam (Brojer et al. 2015). Menurut Abou-Rawash et al. (2012) HPAI H5N1 pada ayam juga menimbulkan lesi pada trakhea, paru, hati, ginjal, otak, limpa, pankreas, jantung, usus proventrikulus, dan jengger, sedangkan pada itik lesi ditemukan pada organ trakhea, paru, hati, ginjal, otak, limpa, panreas, jantung, usus. Penelitian lain pada itik menunjukkan bahwa lesi histopatologi berupa peradangan sistem pernapasan dengan penyebaran virus sistemik yang bersifat akut disertai antigen yang berjumlah sangat banyak dengan IHK pada epitel saluran pernapasan, dan

antigen dalam jumlah kecil hingga sedang ditemukan di berbagai jaringan lain. Apabila jumlah antigen yang dideteksi lebih sedikit tetapi lesi histopatologinya parah, maka kemungkinan puncak infeksi virus belum terjadi pada saat itik mati/dinekropsi (Wibawa et al. 2014). Sebaliknya, dilaporkan bahwa virus HPAI H5N1 clade 2.3.2 di Indonesia lebih patogen pada ayam daripada pada itik dan dapat ditularkan dengan mudah dari itik yang terinfeksi terutama ketika mereka berada dalam tahap infeksi akut (hari 3 pasca infeksi) (Damayanti et al. 2017). Selain itu, *shedding* virus HPAI H5N1 pada itik dapat terjadi hingga 14 hari pasca infeksi meskipun antibodi tidak sepenuhnya mampu melawan virus, sehingga infeksi dapat berulang pada inang (Wibawa et al. 2014). Namun pada itik domestik yang terinfeksi virus HPAI H5N1 di Indonesia, periode menularnya singkat dan penghentiannya bertepatan dengan peningkatan antibodi (Wibawa et al. 2014)



Gambar 3: Distribusi antigen pada organ itik: otak (A), folikel bulu (B), konjungtiva mata (C) dan pankreas (D). Pewarnaan IHK, substrat DAB

Patogenitas virus HPAI H5N1 di beberapa spesies dan *breed* itik dan rute infeksi/inokulasi akan mempengaruhi keparahan penyakit. Disebutkan bahwa itik Pekin dan Muscovy yang diinokulasi secara intranasal, intrakloakal, atau intraokular kesemuanya dapat menyebabkan itik terinfeksi namun derajat keparahan penyakit tergantung virulensi virus H5N1 tersebut. Itik Muscovy lebih parah gejala klinisnya dan mortalitasnya lebih tinggi daripada itik Pekin. Artinya ternak itik lebih peka terhadap virus HPAI H5N1 apapun rute infeksi. Temuan tersebut berguna untuk perencanaan surveilans dan pengendalian HPAI di suatu area (Pantin-Jackwood et al. 2013). Selain itu, pada ayam dan itik yang terinfeksi H5N1 clade 2.1.3 isolat lokal Indonesia, sebagian besar itik tidak menunjukkan gejala klinis, tetapi secara imunohistokimiawi, folikel bulu yang belum matang menunjukkan hasil positif selama periode infeksi akut, sehingga folikel bulu yang belum matang merupakan sampel alternatif untuk diagnosis HPAI pada ayam

dan itik (Nuradji et al. 2015). Pada itik, lesi dan antigen virus terutama terdeteksi pada epidermis bulu dan folikel, sedangkan pada ayam, kebanyakan ditemukan pada dermis (Nuradji et al. 2017)

Pengendalian terhadap virus HPAI H5N1 clade 2.3.2 ini perlu mempertimbangkan pengawasan terhadap lalu lintas perdagangan unggas liar (termasuk itik). Kesulitan dalam mengendalikan pergerakan unggas lokal dan regional dan produk-produknya, masalah dalam menangani perdagangan (khususnya yang ilegal) unggas hidup, dan terbatasnya partisipasi peternak unggas dalam strategi pengendalian dianggap sebagai faktor penting yang berkontribusi terhadap epidemi virus HPAI H5N1 (Peiris et al. 2007). Studi sebelumnya menunjukkan bahwa itik domestik kemungkinan merupakan sumber infeksi virus H5N1 HPAI untuk ayam di peternakan itik kecil di Indonesia dan praktik peternakan itik di desa-desa dapat meningkatkan risiko HPAI H5N1 (Henning et al. 2013).

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan kesamaan patogenitas HPAI H5N1 clade 2.3.2 baik pada ayam maupun itik dan mempunyai predileksi terhadap organ tertentu. Itik mempunyai predileksi (*tissue tropism*) pada organ nasal, orbital (mata), folikel bulu, dan pankreas, sedangkan pada ayam predileksinya ada pada organ proventrikulus, hati, limpa, usus, dan bursa fabrisius. Predileksi terhadap organ-organ tersebut ditunjukkan dengan derajat keparahan lesi yang bervariasi, dari ringan, sedang, dan parah serta berkorelasi positif dengan jumlah/level antigen yang dapat dideteksi pada organ terkait secara imunohistokimiawi. Hasil penelitian ini menguatkan dugaan bahwa selain ayam, itik sebagai unggas liar bersifat rentan terhadap infeksi HPAI H5N1 clade 2.3.2, sehingga harus terus diwaspadai dalam menyebarkan virus H5N1 di Indonesia.

KONTRIBUSI PENULIS

Damayanti R adalah kontributor utama sedangkan Indriani R dan Nuradji H adalah kontributor anggota.

DAFTAR PUSTAKA

- Abou-Rawash A, Abd-EL-Hamed, Abd-Ellatieff, Elsamanoudy S. 2012. Recent outbreaks of highly pathogenic avian influenza virus in chickens and ducks in Egypt: Pathological Study. 6:13–21.
- Brojer C, van Amerongen G, van de Bildt M, van Run P, Osterhaus A, Gavier-Widen D, Kuiken T. 2015. Pathogenicity and tissue tropism of currently circulating highly pathogenic avian influenza A virus (H5N1; clade 2.3.2) in tufted ducks (*Aythya fuligula*). Vet Microbiol. 180:273–280.

- Cagle C, Long T, Nguyen T, Wasilenko J, Adams SC, Cardona CJ, Spackman E, Suarez DL, Pantin-jackwood MJ. 2011. Pekin and muscovy ducks respond differently to vaccination with a H5N1 highly pathogenic Avian Influenza (HPAI) commercial inactivated vaccine. *Vaccine* 29:6549–6557.
- Damayanti R, Wiyono A, Nuradji H, Cahyono M. 2017. The pathogenicity of H5N1 highly pathogenic Avian Influenza (HPAI) virus clade 2.3.2. in Indonesian indigenous chicken by contact transmission with infected duck. *J Indonesian Trop Anim Agric.* 42:72–8072.
- Dharmayanti N, Indriani R. 2015. Efikasi vaksin inaktif bivalen Avian Influenza virus subtype H5N1. *J Biol Indones.* 1:169–176.
- [Dirjen PKH] Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2013. Vaksinasi AI pada Itik/Unggas. Surat Keputusan No. 03051/PD 620/F/01/2013. Jakarta (Indones): Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan.
- Feldman A.T., Wolfe D. 2014. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. In: Day C, Ed. *Histopathology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 1180. New York (USA): Humana Press.
- Henning J, Morton JM, Wibawa H, Yulianto D, Usman TB, Prijono W, Junaidi A, Meers J. 2013. Incidence and risk factors for H5 highly pathogenic avian influenza infection in flocks of apparently clinically healthy ducks. *Epidemiol Infect.* 141:390–401.
- Indriani R, Dharmayanti N. 2014. Prototipe virus A/Duck/Sukoharjo/Bbvw-1428-9/2012 sebagai kandidat vaksin AI subtype H5N1 Clade 2.3.2 pada itik lokal. *JITV.* 19:152–158.
- Keawcharoen J, Van Riel D, Van Amerongen G, Bestebroer T, Beyer WE, Van Lavieren R, Osterhaus ADME, Fouchier RAM, Kuiken T. 2008. Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis.* 14:600–607.
- Kuchipudi S V., Tellabati M, Sebastian S, Londt BZ, Jansen C, Vervelde L, Brookes SM, Brown IH, Dunham SP, Chang KC. 2014. Highly pathogenic avian influenza virus infection in chickens but not ducks is associated with elevated host immune and pro-inflammatory responses. *Vet Res.* 45. Article no 118.
- Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, Rahardjo AP, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Estoepongastie AT, Chaisingh A, Auewarakul P, Long HT, Hanh NT, Webby RJ, Poon LL, Chen H, Shortridge KF, Yuen KY, Webster RG, Peiris JS. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature.* 430:209-13.
- Marinova-petkova A, Georgiev G, Seiler P, Darnell D, Franks J, Krauss S, Webby RJ, Webster RG. 2012. Spread of influenza virus A (H5N1) clade 2.3.2.1 to Bulgarian in Common Buzzards. *Emerg Infect Dis.* 18:1596-1602.

- Muramoto Y, Ozaki H, Takada A, Park CH, Sunden Y, Umemura T, Kawaoka Y, Matsuda H, Kida H. 2006. Highly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens. *Microbiol Immunol.* 50:73–81.
- Nagarajan S, Tosh C, Smith DK, Sriyal J, Peiris M, Murugkar HV, Sridevi R, Kumar M, Katare M, Jain R. 2012. Avian Influenza (H5N1) Virus of Clade 2.3.2 in Domestic Poultry in India. *PLoS One.* 7:1-8.
- Nuradji H, Bingham J, Lowther S, Wibawa H, Colling A, Long NT, Meers J. 2015. A comparative evaluation of feathers, oropharyngeal swabs, and cloacal swabs for the detection of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection in experimentally infected chickens and ducks. *J Vet Diagnostic Investig.* 27:704-715.
- Nuradji H, Bingham J, Payne J, Harper J, Lowther S, Wibawa H, Long NT, Meers J. 2017. Highly pathogenic Avian Influenza (H5N1) virus in feathers: tropism and pathology of virus-infected feathers of infected ducks and chickens. *Vet Pathol.* 54:226-233.
- Pantin-Jackwood M, Swayne DE, Smith D, Shepherd E. 2013. Effect of species, breed and route of virus inoculation on the pathogenicity of H5N1 highly pathogenic influenza (HPAI) viruses in domestic ducks. *Vet Res.* 44:1-11.
- Pantin-Jackwood MJ, Swayne DE. 2009. Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection in birds. *OIE Rev Sci Tech.* 28:113-136.
- Peiris JSM, De Jong MD, Guan Y. 2007. Avian influenza virus (H5N1): A threat to human health. *Clin Microbiol Rev.* 20:243-267.
- Reid SM, Shell W, Barboi G, Onita I, Turcitu M, Marinova-petkova A, Goujgoulova G, Webby RJ, Webster G, Russell C. 2013. NIH Public Access. 58:76-78.
- Swayne DE. 2007. Progress report of vaccine efficacy. International Avian Influenza vaccination. Jakarta 11-12 Juni 2007. FMPI, DEPTAN, USDA
- Swayne DE, Suarez DL, Spackman E, Jadhao S, Dauphin G, Kim-Torchetti M, McGrane J, Weaver J, Daniels P, Wong F. 2015. Antibody titer has positive predictive value for vaccine protection against challenge with natural antigenic-drift variants of H5N1 high-pathogenicity Avian Influenza viruses from Indonesia. *J Virol.* 89:3746-3762.
- Wibawa H, Bingham J, Nuradji H, Lowther S, Payne J, Harper J, Junaidi A, Middleton D, Meers J. 2014. Experimentally infected domestic ducks show efficient transmission of Indonesian H5N1 highly pathogenic Avian Influenza virus, but lack persistent viral shedding. Davis T, editor. *PLoS One.* 9:e83417.
- Wibawa H, Prijono WB, Dharmayanti N, Irianingsih SH, Miswati Y, Rohmah A, Andesyha E, Romlah DRSD, Safitria K. 2012. Investigasi wabah penyakit pada itik di Jawa Tengah, Yogyakarta dan Jawa Timur: Identifikasi sebuah clade baru virus avian influenza subtipe H5N1 di Indonesia. *Bul Lab Veteriner Balai Besar Vet Wates Jogjakarta.* 12:2–8.

DISKUSI

Pertanyaan

1. *Apa yang menyebabkan tingkat keparahan pada organ yang sama pada itik berbeda dibandingkan pada organ ayam?*
2. *Metode IHK yang digunakan menggunakan sistem apa dan mengapa memilih sistem tersebut?*
3. *Dari gejalanya, perbedaan apa yang paling menciri dari infeksi H5N1 pada ayam dan pada itik?*

Jawaban

1. *Tingkat keparahan lesi berbeda karena respons masing-masing host berbeda dalam menangkal infeksi dan virus HPAI H5N1 clade 2.3.2 mempunyai predileksi yang khas pada organ tertentu yang berbeda antara itik dan ayam yang berkorelasi positif dengan derajat keparahan lesi dan jumlah antigen yang dideteksi secara imunohistokimia (IHK).*
2. *Metode IHK yang dipakai yaitu avidin-biotin kompleks peroksidase, dipilih karena lebih sensitif dan lebih akurat dalam mendeteksi antigen pada jaringan karena metode ini memanfaatkan afinitas vitamin biotin terhadap glikoprotein putih telur avidin yang afinitasnya sangat kuat terhadap molekul biotin karena tiap molekul avidin mempunyai 4 tempat (site) kombinasi dengan biotin sehingga amplifikasi dan cara merespons sinyal yang disampaikan oleh antigen target lebih kuat.*
3. *Pada ayam gejala syaraf yang menonjol berupa sianosis pada jengger, bintik-bintik perdarahan pada subkutan kulit pada kaki dan gejala syaraf, sedangkan pada itik berupa diare, sinusitis, dan kekeruhan kornea mata.*