

DIAGNOSIS LABORATORIK FLU BURUNG (H5N1)

(Laboratoric Diagnosis of Avian Influenzae (H5n1))

B. Mulyadi*, Prihatini*

ABSTRACT

Pandemic of Avian influenzae (AI) cause outbreak in Asia including in Indonesia. Transmission of virus are caused by direct contact with avian animals, swine poultry, horses or dogs to human, maybe could also happened between human being. Some victims of AI showed signs and symptoms of respiratoric failure, such as: progresive respiratoric failure difuse, bilateral, infiltration and like ARDS (=acute respiratoric distress syndrome). Beside those multiorgan failure which showed signs of renal disfunction, including cardiac dilatation and supraventricular tachyarrythmias. Other complications that may happened including ventilator- associated pneumoniae, pulmonary hemorrhage, pneumothorax, pancytopenia, Reye's syndrome and sepsis syndrome without documented bacteremia. The illness begins abruptly acute, worse and manifested with high fever, myalgias, and non-productive cough frequently present in AI (H5N1) infections. This bibliography study, consist of reviewing the screening examination such as serologic assay, exactly assay of viral culture and RT-PCR. The results of this study may get the information which is sensitive and spesific for diagnosing the disease. In this case should be known the neccesity of some assays phases to assist the exact diagnosis of AI. AI disease spreading in poultry or migration endemic area must be monitored.

Key words: virus avian influenzae (AI) H5N1, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), pandemic influenzae.

PENDAHULUAN

Epidemiologi

Penyakit flu burung (*bird flu*, *avian influenza*/AI) ialah penyakit yang disebabkan oleh virus influenza tipe A dan ditularkan antar unggas. Unggas penular tersebut ialah burung, bebek, ayam, selain itu dapat ditularkan oleh beberapa hewan yang lain seperti babi, kuda, anjing laut, ikan paus, dan musang. Data lain menunjukkan penyakit ini bisa terdapat di burung puyuh dan burung onta. Penyakit ini ditularkan dari burung ke burung, tetapi dapat juga menular ke manusia.^{2,3}

Pada tahun 1918 terjadi kejadian luar biasa virulen influenza A (H1N1) yang mengakibatkan kematian 20 sampai 40 juta orang. Peristiwa epidemiologik terjadi pada tahun 1957 (H2N2) dan 1968 (H3N2), keduanya berasal dari Asia yang menyebabkan kematian 1 juta orang.

Antara flu Spanyol 1918 dan H5N1 terdapat kesamaan, yaitu mempunyai virulensi tinggi, dan tidak mempunyai kekebalan untuk manusia, terutama di kelompok usia tertentu.¹ Meskipun ke dua virus

mempunyai perbedaan dalam transmisi ke manusia, terdapat hubungan sirkulasi virus H5N1 yang terlibat dalam strain pandemik penyesuaian di manusia melalui mutasi genetik atau dengan strain influenza manusia.¹ Di laporkan bahwa di Asia 44 infeksi H5N1, 32 diantaranya meninggal, dan Kamboja, Cina, Indonesia, Laos, Malaysia, Thailand, dan Vietnam terjangkit H5N1 di peternakan unggas.¹

Jalur Pantura-Indonesia, terutama di Kabupaten Indramayu mungkin termasuk daerah jangkitan virus penyebab, karena wilayah udaranya selama ini menjadi jalur lalu lintas jutaan burung setiap pergantian musim. Pada Januari 2004, di beberapa provinsi di Indonesia terutama Bali, Botabek (Bogor, Tangerang, Bekasi), Jawa Timur, Jawa Tengah, Kalimantan Barat, dan Jawa Barat dilaporkan kejadian kematian ayam yang luar biasa. Jumlah unggas yang mati akibat wabah penyakit AI di 10 provinsi diperkirakan 3.842.275 ekor dan paling tinggi di provinsi Jawa Barat sebesar 1.541.427 ekor. Awal kematian tersebut diduga akibat virus *New Castle*, tetapi pengukuhan terakhir oleh Departemen Pertanian disebabkan oleh AI (H5N1).²

Pada 19 Januari 2004, WHO mengumumkan bahwa 8 dari 10 orang yang terinfeksi ditemukan meninggal di Vietnam, sedangkan di Thailand sudah 6 orang tewas. Jika dibandingkan dengan SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*), AI (H5N1) ini lebih sedikit kasusnya. Dilaporkan bahwa 25 kasus di seluruh dunia yang meninggal 19 orang (*Case*

* Bagian Patologi Klinik FK-UNAIR-RSU Dr Soetomo, E-mail: pdspatklin_sby@telkom.net

Fatality rate/CFR = 76%), sedangkan pada 8098 kasus penyakit SARS yang meninggal hanya 774 (CFR=9,6%).^{4,5}

Kekhawatiran terbesar ialah kemungkinan adanya pergeseran genetik subtype H5N1 akibat interaksi dengan virus influenza manusia atau babi, sehingga menghasilkan subtype baru yang virulen dan mudah menyebar dari manusia ke manusia lain.

Patogenesis

Penyebab AI adalah virus influenza tipe A subtype H5, H7, dan H9, virus H9N2 tidak menyebabkan penyakit berbahaya bagi burung, tidak seperti H5 dan H7. Awalnya virus influenza A (H5N1) hanya ditemukan di hewan seperti: burung, bebek, dan ayam, tetapi sejak 1997 virus ini mulai menjangkiti manusia (penyakit *zoonosis*).²

Faktor virulen H5N1 termasuk kemampuan yang tinggi memecah hemagglutinin yang dapat diaktifkan oleh multipel seluler protease, spesifik substitusi di polimerase dasar protein 2 (Glu627Lys) yang menguntungkan replikasi, dan substitusi di nonstruktural protein 1 (Asp92Glu) yang meningkatkan hambatan oleh *interferon* dan *tumor necrosis factor α* (TNF-α) in vitro dan terjadi perbanyakan (replikasi) di babi, seperti terurai menjadi *cytokine*, sebagian TNF-α di makrofag manusia yang terpajan virus.⁴

Umumnya virus influenza, baik di manusia atau unggas adalah kelompok famili *Orthomyxoviridae*. Berinteraksi dengan *mucin*, berdiameter 80–110 nm, mempunyai 8 segmen genom RNA (*ribonucleic acid*) rantai tunggal, mempunyai *envelope* atau pembungkus, merupakan partikel *pleiomorphic* berukuran sedang yang terdiri atas 2 lapis lemak dan

terletak di atas matriks M1 (M1) yang mengelilingi genom. Di permukaan *envelope* terdapat dua tonjolan glikoprotein yaitu hemagglutinin (H) dan neuraminidase (N). Protein lain selain H dan N, virus influenza A juga mempunyai protein matriks M1, M2, nukleoprotein (NP), polimerase (PB1, PB2, PA), NS1, dan NEP. Masing-masing protein mempunyai fungsi yang berbeda.^{4,6,7,8}

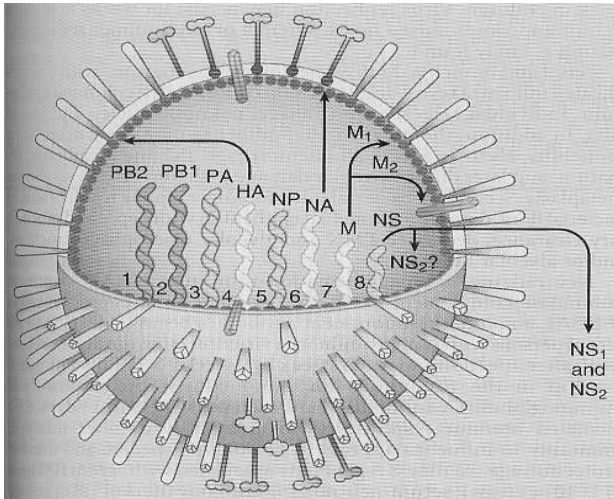
Analisis filogenetik menunjukkan bahwa genotipe Z dominan dan virus mempunyai 2 perbedaan pembungkus, satu diisolasi dari Kamboja, Laos, Malaysia, Thailand, dan Vietnam dan yang lain dari Cina, Indonesia, Jepang, dan Korea selatan.

Baru-baru ini kelompok terpisah berasal dari isolat utara Vietnam dan Thailand yang terdiri atas perubahan varian yang mendekati reseptor yang melekat dan sedikit mengandung residu arginin di belahan polybasic hemagglutinin. Meskipun demikian, yang penting perubahan gen dan biologi berkenaan dengan epidemiologi manusia atau virulensi yang tak tentu.⁴

Beberapa tipe virus influenza terdapat di manusia dan hewan, yaitu virus influenza A, B, dan C. Pembagian tersebut didasarkan pada perbedaan antigenik NP dan M1 masing-masing virus. Tidak seperti virus influenza B dan C, virus influenza A mempunyai dua sifat yang mudah berubah. Yaitu *antigenic shift* (pergeseran genetik) yang disebabkan oleh transmisi virus influenza, yang inang alaminya bukan manusia ke manusia atau infeksi bersamaan antara dua virus pada satu sel yang akan menimbulkan strain virus baru dan spesifisitas reseptor terhadap sel pejamu yang berubah. Di samping itu, terdapat *antigenic drift* (mutasi titik) akibat substitusi asam amino glikoprotein

Tabel 1. Protein influenzae A (dikutip dan diterjemahkan dari Lamb, King, 1996)³

Penandaan	Tempat (perkiraan jumlah pervirion)	Fungsi	lain
Hemagglutinasin (HA)	Permukaan (500)	Pelekatan sel dan penetrasi, aktivitas penyatuan (fusi)	Subtipe dan spesifik antigen strain
Neuraminidase (NA)	Permukaan (100)	pelepasan Virus, aktivitas enzim	Subtipe dan spesifik antigen strain Sisi aksi dari zanamivir, oseltamivir carboxylate
Membran atau M1 matrix	Di dalam (interna) (3000)	Struktur pembungkus (<i>envelope</i>) utama protein, pertemuan virus	tipe spesifik antigen dari ribavirin
M2	Permukaan (20–60)	Virus tak dibungkus dan pertemuan, hubungan ion	Sisi aksi dari amantadine, rimantadine
Nukleoprotein (NP)	Di dalam (interna) (1000)	Berkaitan dengan RNA dan protein polimerase	Macam (tipe) antigen spesifik
Polymerase (PB1, PB2, PA)	Di dalam (interna) (30–60)	Replikasi RNA dan transkripsi	Kemungkinan sisi dari aksi
NSI	Nonstruktural (sel terinfeksi)	Pengaturan replikasi virus	Interferon antagonist
NEP	Di dalam (internal) (130–200)	Faktor ekspor inti (nuclear)	Bentuk NS2



Gambar 1. Struktur virus influenza A³

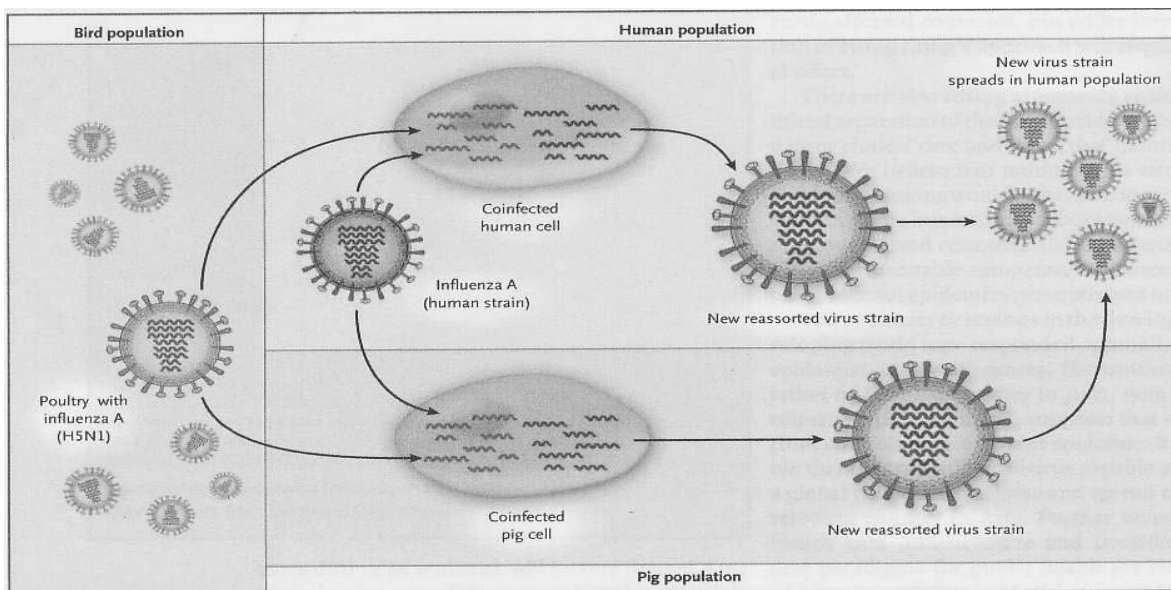
hemagglutinin virus sebagai respon terhadap imunitas tubuh penderita. *Antigenic shift* pada umumnya terjadi di pejamu *intermediate* misalnya babi karena hewan tersebut memiliki 2 reseptor sekaligus yaitu α 2,6 sialic acid dan α 2,3 sialic acid pada permukaan sel epitelnya.^{2,3,6,9,10}

Kedua sifat tersebut dapat menyebabkan kejadian pandemik. Di manusia, virus influenza A dan B dapat menyebabkan wabah flu yang luas, sementara virus influenza C menyebar secara periodik, ringan dan tidak menyebabkan wabah. Untuk mengklasifikasikan secara rinci, masing-masing tipe tersebut dibagi menjadi sub tipe berdasar kelompok glikoprotein H dan N.

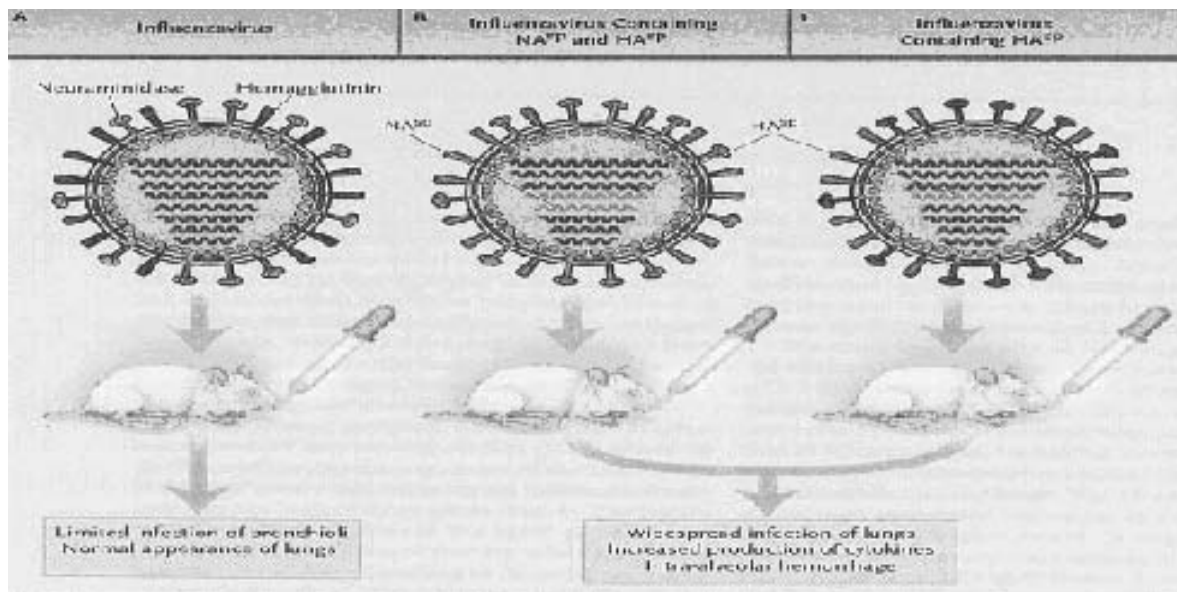
Sampai saat ini sub tipe yang dapat diidentifikasi ialah H1 sampai H15 dan N1 sampai N9.^{3,10} Glikoprotein H merupakan dasar perbedaan sub tipe dan menentukan virulensi sub tipe virus influenza A. Penelitian Kobasa et al pada tahun 2004 menunjukkan bahwa glikoprotein H menentukan virulensi strain virus influenza A. Dalam penelitian tersebut digunakan glikoprotein H dan N yang mempunyai genetik yang mirip dengan strain penyebab pandemi *Spanish Influenza* tahun 1918–1919 yang diberikan pada hewan percobaan tikus.¹¹

Awalnya virus influenza di manusia hanya H1N1, H2N2, H3N2. Sejauh ini juga disebabkan oleh virus H5N1, H9N2 dan H7N7. Sub tipe yang sangat virulen ialah H5N1, virus tersebut dapat hidup di air sampai 4 hari pada suhu 22° C dan lebih dari 30 hari pada 0° C di dalam kotoran dan tubuh unggas yang sakit virus dapat bertahan lebih lama, virus akan mati dengan pemanasan 60° C selama 30 menit atau 56° C selama 3 jam, detergen, desinfektan misalnya formalin atau iodine.^{1,7}

Penularan AI (H5N1) terjadi karena *droplet infection* (infeksi akibat percikan cairan hidung/mulut) baik akibat kontak langsung maupun tidak langsung. Transmisi langsung dapat melalui sentuhan unggas/manusia yang terinfeksi, melalui udara jarak pendek seperti bersin, melalui kontak sosial yang intensif (ciuman). Transmisi tidak langsung dapat melalui perantara benda lain yang telah tercemar, melalui serangga (lalat *Musca domestica*) tetapi masih dugaan, dan melalui udara jarak jauh. Tempat masuk virus (*port de entry*) ialah mulut, hidung, dan selaput lendir mata.^{1,3,8,9,10,13} Infeksi dan



Gambar 2. Antigenic shift¹



Gambar 3. Protein influenzae A. Glikoprotein H menentukan sub tipe dan virulensi virus influenza¹⁴

Hemagglutinin sebagai penentu virulensi influenza

Perbedaan *strain* virus influenza mempunyai perbedaan pengaruh patologi. Misal infeksi virus influenza Spanyol lebih dari 20 juta meninggal pada tahun 1918–1919, sebagian besar karena pneumonia hemoragik. Untuk identifikasi komponen virus, tikus yang diadaptasi dengan virus influenza A (Panel A) dimodifikasi oleh Kobasa *et al.* Ekspresi virus bentuk hemagglutinin dikode oleh gen *strain* virus influenza Spanyol 1918.

(HA^{SP}), tunggal (Panel C) atau dalam kombinasi (Panel B) dengan neuraminidase dikode oleh gen gen *strain* virus influenza Spanyol 1918(HA^{SP}). Disimpulkan bahwa protein HA^{SP} menguntungkan produk cytokine, inflamasi dan pneumonia hemoragik sebagai karakteristik virulensi influenza.

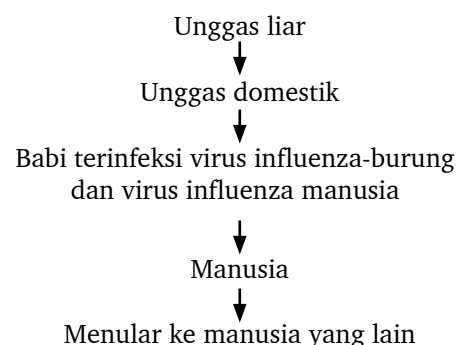
replikasi primer virus terjadi di sel epitel kolumnar saluran pernapasan menyebabkan kerusakan silia, inflamasi, nekrosis dan deskuamasi epitel saluran pernapasan. Infeksi yang terjadi akan menginduksi sel B (antibodi terhadap NP, M1, H dan N). Molekul antibodi dapat menghancurkan virus bebas dengan berbagai cara, yaitu aktivasi jalur komplemen klasik atau menyebabkan agregasi, meningkatkan fagositosis dan kematian intrasel. Sel T (CD 4 dan CD 8) yang menghasilkan sitokin proinflamasi (*interleukin 6, 10, interferon α 1, tumor nekrosis factor α* yang mengaktifkan sel makrofag dan NK cell (*natural killer*) untuk membunuh virus yang tumbuh dalam sitosolnya. Sel T spesifik membunuh sasaran segera setelah proses mengenali peptida virus yang berhubungan dengan MHC I (*major histocompatibility complex*). Sitokin proinflamasi menyebabkan demam dan gejala sistemik, semakin tinggi kadarnya, semakin berat derajat keparahan penyakit penderita.

Sekali *immunological memory* terbentuk karena infeksi primer atau vaksinasi, maka kadar antibodi di sekret saluran pernapasan meningkat lebih cepat bila terdapat pajanan virus yang sama.^{9,11,13,14} Menurut WHO, infeksi AI (H5N1) lebih mudah menular dari unggas ke manusia dibandingkan dengan dari

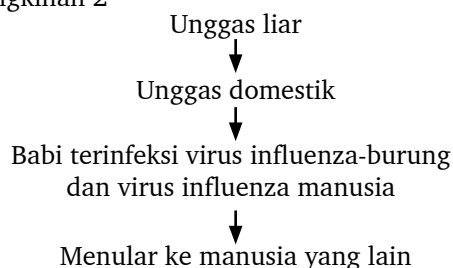
manusia ke manusia. Sampai saat ini belum terbukti penularan dari manusia ke manusia atau penularan manusia lewat daging yang dikonsumsi. Satu-satunya cara virus influenza A (H5N1) dapat menyebar dengan mudah dari manusia ke manusia ialah jika virus influenza A (H5N1) tersebut bermutasi dan bercampur dengan virus influenza manusia.

Secara umum ada tiga kemungkinan mekanisme penularan dari unggas ke manusia.²

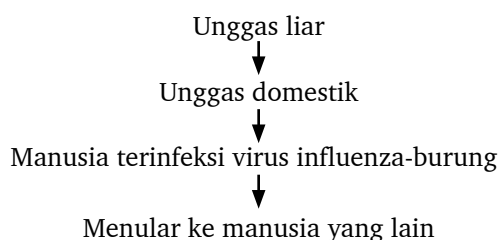
Kemungkinan 1



Kemungkinan 2



Kemungkinan 3



Gambaran Klinis

Masa inkubasi AI (H5N1) lebih lama daripada influenza manusia umumnya. Pada tahun 1997, sebagian kasus terjadi dalam 2–4 hari setelah terpajan. Laporan yang terbaru menunjukkan interval yang sama tetapi sampai dengan 8 hari. Inkubasi pada anak dapat sampai 21 hari setelah terpajan. Hal ini kemungkinan karena tidak tahu bilamana waktu terjadinya pajanan terhadap hewan yang terinfeksi atau sumber lain di lingkungan. Masa inkubasi di unggas ialah 1 minggu.^{2,4}

Tanda dan gejala pada unggas

Gejala unggas yang sakit beragam, mulai dari gejala ringan sampai sangat berat. Hal ini bergantung keganasan virus, lingkungan, dan keadaan unggas sendiri. Gejala awal berupa penurunan produksi telur. Gejala yang timbul seperti jengger berwarna biru, kepala bengkak, sekitar mata bengkak, demam, diare, gangguan pernapasan berupa batuk, bersin, depresi dan tidak mau makan. Di beberapa kasus, unggas mati tanpa gejala. Kematian terjadi setelah 24 jam timbul gejala. Di kalkun, kematian dapat terjadi dalam 2–3 hari.²

Tanda dan gejala pada manusia

Sebagian besar penderita gejala AI (H5N1) pada dasarnya sama dengan influenza lainnya awal demam lebih 38° C dan gejala saluran napas bawah. Diare, muntah-muntah, nyeri perut, nyeri dada (pleuritik) dan perdarahan dari hidung dan gusi pada beberapa penderita. Sputum yang dihasilkan bervariasi kadang-kadang dengan darah, pernapasan tertekan (*respiratory distress*), tachipnea dan inspirasi dedas (*crackle*). Kegagalan pernapasan yang progresif difus,

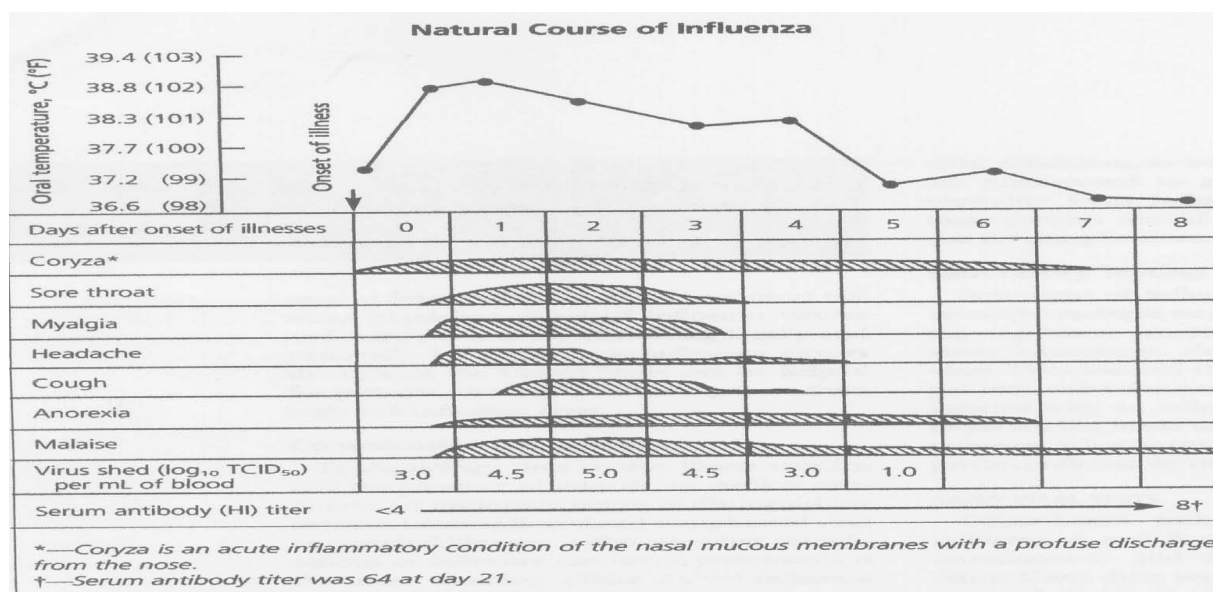
bilateral, infiltrasi dan tampilan gejala napas akut (*ARDS=acute respiratory distress syndrome*). Kegagalan banyak organ disfungsi ginjal, jantung termasuk dilatasi dan supraventrikular aritmia. Komplikasi yang lain ventilator berhubungan pneumonia, perdarahan paru, pneumothoraks, pancytopenia, gejala dari Reye dan sepsis tanpa bakteremia.⁴ Awal penyakit yang tiba-tiba dan cepat memburuk, demam tinggi, nyeri otot, dan batuk kering sering dijumpai di infeksi AI (H5N1).⁹

Diagnosis banding AI (H5N1) diantaranya ialah *respiratory syncytial virus* (RSV), *adenovirus*, *parainfluenza virus*, *rhinovirus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*. Ada beberapa perbedaan gejala AI (H5N1) dan influenza lain.

Klasifikasi Diagnosis

Departemen Kesehatan Republik Indonesia (DEPKES RI) membagi diagnosis AI (H5N1) di manusia menjadi kasus dugaan, kemungkinan (*probable*), dan kasus terkukuhkan (konfirmasi). Kasus dugaan AI (H5N1) ialah bila seseorang mengalami infeksi saluran pernapasan akut (ISPA) disertai demam ($\geq 38^\circ \text{C}$), batuk dan atau sakit tenggorokan dengan salah satu kegiatan sebelumnya. Misalnya: seminggu terakhir mengunjungi peternakan yang terjangkit KLB (kejadian luar biasa) AI (H5N1), bersentuhan dengan kasus terkukuhkan (konfirmasi) AI (H5N1) dalam masa penularan, bekerja di laboratorium yang memproses spesimen manusia atau hewan yang dicurigai menderita AI (H5N1). Dalam hal itu pemeriksaan darah menunjukkan lekopeni (leukosit $\leq 3000/\mu\text{L}$) dan atau trombositopeni (trombosit $\leq 150.000/\mu\text{L}$), ditemukan titer antibodi $<1:20$ terhadap H5 dengan pemeriksaan uji HAI, foto dada menggambarkan pneumonia atipikal atau infiltrat di kedua sisi paru yang meluas (foto serial). Kriteria kasus dugaan yang lain, jika terjadi ARDS dengan satu atau lebih gejala: lekopeni atau limfopenia dengan atau tanpa trombositopenia, foto dada menunjukkan pneumonia atipikal atau infiltrat kedua sisi paru yang makin luas.

Kasus kemungkinan (*probable*) yaitu kasus suspek dengan salah satu keadaan: bukti laboratorium terbatas mengarah ke virus influenza A H5N1. Misalnya kenaikan 4 kali titer antibodi dengan uji HAI terhadap sepasang serum yang diambil setelah 10–14 hari saat pengambilan yang pertama, terkenalnya antigen atau bahan genetika virus atau adanya titer antibodi spesifik yang sangat tinggi dalam serum tunggal dengan uji penetralan di laboratorium rujukan. Dalam waktu singkat keadaan tersebut berlanjut menjadi pneumonia atau gagal pernapasan, bahkan meninggal dengan pembuktian tidak ada penyebab lain.



Gambar 4. Tanda dan gejala infeksi AI (H5N1) di manusia¹⁶

Tabel 3. Perbedaan antara infeksi AI (H5N1) dan influenza lainnya (virus influenza B dan C) (dikutip dan diterjemahkan dari Montalto et al., 2003)¹⁶

Gambaran	Influenzae	Selesma
Awal serangan	Mendadak	Lebih bertahap
Demam	Suhu biasanya mulai 37,7 sampai 40° C	Tidak umum atau kenaikan hanya 0,5 °C
Nyeri otot	Sangat, umum	Tidak umum
Nyeri sendi	Sangat, umum	Tidak umum
Tidak suka makan	umum	Tidak umum
Sakit kepala	Sangat, umum	Ringan, Tidak umum
Batuk kering	Umum, parah	Ringan, sampai sedang
Tidak enak badan (malasia)	Sangat	Ringan
Capai, lemah	Lebih umum daripada selesma berlangsung sedikit-sedikitnya 2–3 minggu	Sangat ringan, berlangsung pendek
Ketidaknyamanan dada	Umum, parah	Ringan sampai sedang
Hidung tersumbat	Kadang-kadang	Umum
Bersin	Kadang-kadang	Umum
Nyeri tengorok	Kadang-kadang	Umum

* Clusters of more severe or common features may be more likely to predict influenza.^{1,2}

Tabel 4. Komplikasi AI (H5N1)¹⁵

Pneumonia*	Miositis
Otitis media*	Mioglobinuria
Trakeobronkitis*	Ensefalitis
Sinusitis akut*	Transverse myelitis
Reye's syndrome	Guillain-Barre syndrome
Perikarditis	Rhabdomyolysis

Keterangan: * komplikasi yang sering terjadi.

Kasus terkukuhkan (konfirmasi) yaitu kasus kemungkinan (*probable*) yang menghasilkan kultur virus influenza A H5N1 positif, hasil PCR (*polymerase chain reaction*) influenza H5 positif pada laboratorium yang diakui oleh WHO, terjadi peningkatan titer antibodi H5 lebih dari 4 kali dengan uji netralisasi, dengan uji *immunofluorescence assay* (IFA) ditemukan

antigen positif dengan menggunakan antibodi monoklonal A/H5N1.^{2,14,17}

Tes Laboratorik

Pemeriksaan laboratorik umum menunjukkan leukopenia, sebagian limfopenia, trombositopenia ringan sampai sedang, dan sedikit peningkatan aminotransferase. Kadang dijumpai hyperglikemia dan kreatinin meningkat.⁴

Kriteria pengambilan spesimen ialah diagnosis suspek AI (H5N1) dapat ditegakkan, spesimen yang diperlukan untuk mengenali virus influenza A H5N1 diambil pada hari ke 2–14 setelah timbul gejala. Spesimen dapat berupa: usap orofaring dan nasal, bilasan nasofaring (untuk anak usia 2 tahun atau kurang), aspirat spesimen sputum, cairan pleura,

bilasan trakeal, dan bilasan bronkoalveolus. Alat usap yang digunakan sebaiknya terbuat dari *dacron*/rayon steril bertangkai plastik, jangan menggunakan kapas yang mengandung kalsium alginat atau tangkai kayu karena mungkin mengandung bahan yang dapat menghambat pertumbuhan virus tertentu. Pengambilan spesimen yang sah apabila epitel terambil saat dihapus. Bahan dimasukkan ke dalam tabung *cryotube* (tabung tahan suhu beku) yang berisi 2 ml media transport virus yang mengandung *Hank's BSS* dan antibiotika *penstrep* 1000 ug/UI/ml. Penyimpanan spesimen kurang dari 2 hari dapat disimpan pada suhu 4° C, penundaan lebih lama sebaiknya disimpan dalam suhu -70° C. spesimen serum dapat disimpan pada suhu 4° C selama 4 hari dan penyimpanan lebih lama sebaiknya disimpan pada suhu -20° C. Spesimen diambil secara berturut-turut hari ke-1, ke-2, dan ke-3 setelah penderita dinyatakan suspek AI (H5N1) spesimen perlu diambil lagi setiap 2–4 hari selama penderita dirawat, hingga pemeriksaan *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) sebanyak 3 kali berturut-turut negatif. Bahan pemeriksaan lain berupa serum yang diambil dalam fase akut (2–3 hari setelah timbul gejala) dan konvalesen (10–14 hari setelah pengambilan darah yang pertama).^{2,3,8,14,16} Pemeriksaan untuk diagnosis virus influenza A dibagi menjadi 4 kategori yaitu *rapid antigen detection* (IFA, *enzyme immuno assay*/EIA), kultur virus, PCR-RT dan deteksi antibodi spesifik (*Hemagglutination inhibition*/HAI, *Hemagglutination*/HA, uji netralisasi, *enzyme immuno assay*/EIA).^{2,8,13,14,17}

Menemukan antigen virus influenza¹²

Tes ini bertujuan untuk menemukan virus influenza intraselular di spesimen penderita. Hasil dapat diketahui dalam waktu 15–30 menit, metode yang digunakan antara lain IFA, EIA.

Menemukan antigen virus metode IFA (indirect fluorescent)

WHO *Influenza Reagent kit* yang terdiri atas antibodi monoklonal spesifik influenza tipe A/H5N1, antibodi monoklonal spesifik influenza tipe A dan influenza tipe B, antibodi monoklonal spesifik influenza A/H1 dan A/H3. Di samping itu terdapat bahan lain berupa *anti-mouse Ig G FITC (fluorescein isothiocyanate conjugated)*, slide mikroskop, *cover glass*, aseton, mikroskop imunofluoresen, *mountant*.

Prosedur: bahan sel epitel saluran pernapasan dicuci sehingga mukus bersih menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan < 500 g, fiksasi, dan diwarnai dengan antibodi monoklonal spesifik influenza A, penambahan anti *mouse IgG FITC* setelah pencucian dan ikatan kompleks antigen dan antibodi mengalami fluoresensi. Sel epitel saluran pernapasan yang terinfeksi labil dan mudah rusak. Penyimpanan

spesimen dalam suhu dingin menggunakan es selama pemrosesan.

Interpretasi hasil: hasil positif jika dijumpai fluoresensi hijau keunguan di inti dan atau sitoplasma satu atau lebih sel utuh. Hasil tes yang positif perlu dilanjutkan dengan tes guna menentukan sub tipe influenza A dengan antibodi monoklonal yang lebih spesifik^{9,15}

Menemukan antigen metode EIA¹²

Ada 5 macam pemeriksaan antigen virus metode EIA yang sudah tersedia secara komersial. Sensitivitas tes ini bergantung pada kualitas sampel atau isolat, kualitas spesifisitas reagen dan kemampuan personel laboratorium.^{8,11,15}

Kultur/isolasi virus¹²

Isolasi virus ialah teknik sensitiv memisahkan virus AI sebagai uji baku emas untuk mendiagnosis infeksi virus influenza. Keuntungan lain dapat digunakan identifikasi dan penentuan antigen dan karakteristik gen.

Bahan yang diperlukan:

- *Madin-Darby Canine Kidney cells* (MDCK) ATCC CCL 34 (bahan lain dapat berupa *rhesus monkey kidney* atau *cytomologous monkey kidney cell culture* atau *embryonated egg hen*).
- WHO *Influenza Reagent kit* untuk menemukan influenza A/H5. Bahan terdiri atas antigen kontrol:
 - influenza A/H5 (virus yang tidak aktif),
 - serum kambing A/Tern/South Africa/61/H5 digunakan sebagai antisera,
 - serum ayam A/Goose/Hongkong/437-4/99.
- Reagen lain ialah WHO *influenza reagent kit* terdiri dari antigen dan antisera referensi
 - A (H1N1), A (H3N2). Bahan lain berupa
- *Receptor-destroying enzyme* (RDE).
- Sel darah merah (ayam, kalkun, manusia dengan gol O, *guinea-pig*) dalam larutan *Alsever*. RDE dan sel darah merah digunakan dalam pemeriksaan HA atau HAI. Sampel diambil dalam 3-4 hari setelah timbul gejala, segera dibawa ke laboratorium dengan media transport.

Prosedur: mengembangbiakkan sel MDCK dalam media *eagle's minimum essential medium* (EMEM) atau *earle's balance salt solution* (EBSS), inokulasi spesimen yaitu swab atau aspirat dimasukkan ke dalam media MDCK, dan memanen sel yang terinfeksi jika sudah terdapat tanda *cytopathic effect* (CPE), deteksi virus menggunakan IFA, atau supernatan kultur untuk tes HA dan HAI.

Interpretasi hasil: pemeriksaan selesai dalam 3 hari. Pengenceran tertinggi virus yang masih menyebabkan hemaglutinasi dinyatakan sebagai

Tabel 5. Perbandingan pemeriksaan antigen virus influenza metode EIA (dikutip dan diterjemahkan dari Harper et al · 2002)⁹

Nama pemeriksaan & produk	Format	Waktu pemeriksaan	pembacaan	Jumlah yang diperiksa	Sensitivitas	Spesivitas	Acuan & komentar
Directigen RuA; Becton Dickinson www.bd.com	Absorpsi Membrane EIA: menemukan influenza NP	15	Perubahan warna pada kaset	11	62–100 (median 89,7)	84–100 (median 97,2)	Hanya meneukan influenza A saja
Directigen A/B; Becton Dickinson	Absorpsi Membrane EIA: menemukan influenza NP	15	Perubahan warna pada kaset	2	median 90, influenza A, 71 influenza B	median 99,8, influenza A, 98,5 influenza B	Menemukan influenza A & B dan dapat membedakannya
Biostar; Biota www.Biostar.com	immunoassay Optik; menemukan influenza NP	15	Perubahan pada silicon silicon chip yang melapisi cassette	8	37–93 (median 52,7)	73,1–95,7 (median 86)	Menemukan influenza A & B dan tidak dapat membedakan diantaranya
Z stat; Zymex Tx Inc www.zymex.com	Adsorpsi Membrane EIA menemukan influenza neuraminidase	30	Perubahan warna pada kaset kecil	6	65–96 (median 71)	63–92 (median 83)	Menemukan influenza A & B dan tidak dapat membedakan diantaranya
Quick view; Quidel www.quidel.com	Aliran Kapiler Membrane capillary flow; menemukan influenzae NP	10	Dipstick; Perubahan warna	3	74–95 (median 79,2)	76–98 (median 82,6)	Menemukan influenza A & B dan tidak dapat membedakan diantaranya

titrasi HA akhir. HAI akhir merupakan pengenceran akhir antisera yang menghambat hemaglutinasi. Isolat diidentifikasi sebagai influenza A/H5 bila titer 4× lipat atau lebih besar dari titer antiserum yang lain.^{8,14}

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Teknik ini digunakan untuk menemukan *genome* virus influenza. Kebanyakan genom virus adalah *single stranded RNA (ribonucleic acid)*, dan kopi/tiruan *deoxy-ribonucleic acid (cDNA)* harus disintesis dulu menggunakan RT *polymerase*. Dalam tes ini diperlukan *oligonucleotide primers* A/H5 dan N1 yang sudah tersedia secara komersial (*Hexaplex assay, prodesse. Inc*). Beberapa penelitian menunjukkan sensitivitas dan spesifisitas 95–100% dan 93–98%. Tes ini tampaknya lebih tersedia secara luas guna mendiagnosis virus influenza.

Bahan yang dibutuhkan:

- QIAamp viral RNA mini kit,
- QIAGEN Onestep RT-PCR kit
- RNA ase inhibitor (ABI) 20U/μl
- tabung *microcentrifuge* steril, 0,5 dan 1,5 ml,
- Sepasang primer:
HA primer gen untuk amplifikasi H5 (modifikasi Yuen et al. 1998)
H5-1: GCC ATT CCA CAA CAT ACA CCC
H5-2: TAA ATT CTC TAT CCT TTC CAA
Ukuran produk amplifikasi: 358 bp

NA primer gen untuk amplifikasi N1(modifikasi Wright et al. 1995)

NI-1: TTG CTT GGT CGG CAA GTG C

NI-2: CCA GTA CAC CCA TTT GGA TCC

Ukuran produk amplifikasi: 615 bp

- kontrol positif (WHO H5 *reference laboratory*),
- Bufer PCR,
- pipet 10, 20, 100 ul,
- *microcentrifuge* 13000 rpm,
- *vortex mixer*,
- *thermocycler*,
- Nampan *agarose gel*,
- perangkat elektroforesis dan *power supply*,
- *Transilluminator* UV (ultraviolet) atau UV lampu dengan panjang gelombang 302 nm.

Prosedur RT-PCR:

1. Tahap ekstraksi RNA: 140ul spesimen ditambah QIAamp viral RNA, menggunakan *random hexamers* (konsentrasi akhir 2,5 uM). Penambahan *reverse transcriptase*, kemudian diperam (inkubasi) 10 menit pada suhu ruangan lalu 42° C selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan pemanasan 95° C selama 5 menit lalu didinginkan dengan es. Dalam proses ini didapatkan cDNA yang akan diperbanyak sebagai *template* (cetakan) pada proses penggandaan atau amplifikasi selanjutnya.
2. Tahap amplifikasi DNA: persiapan PCR *master mixture* diperlukan reagen 10× bufer PCR

sebanyak 5 ul, ekstra MgCl₂ (25 mM) konsentrasi akhir 2 mM sebanyak 1 ul, dNTP (2,5 mM each) sebanyak 4 ul, *forward primer* (5uM) sebanyak 5 ul, *reverse primer* (5 uM) sebanyak 5 ul, air 25 ul, enzim polimerase/*taq polymerase* (5 U/ul) sebanyak 0,25 ul. Primer dan enzim polimerase tersedia berlebihan, maka produk siklus pertama dapat berfungsi sebagai cetakan untuk siklus berikutnya, begitu seterusnya. Kemudian dimasukkan 45 ul *master mix* ke dalam tiap tabung PCR 0,2 ml, tiap tabung ditambahkan 5 ul cDNA. Pengaturan kondisi PCR selanjutnya dalam 40 siklus dengan kondisi 94° C 3 menit; suhu 94° C selama 30 detik (denaturasi yaitu pemisahan untai DNA), 45° C 30 detik (*annealing* yaitu penempelan primer dengan untai DNA), 72° C 1 menit; 72° C 7 menit (*extension* yaitu sintesis materi DNA baru) dan proses ini menggunakan alat *thermocycler* (Amershan Pharmacia Biotech System).

3. Tahap analisa produk PCR: hasil amplifikasi DNA yang berupa jutaan DNA dapat diperlihatkan di elektroforesis *agarose gel* 1,5–2% menggunakan pewarnaan *ethidium bromide*, diamati secara penglihatan tanda berat molekul dan pita PCR di bawah sinar UV.

Interpretasi hasil: pemeriksaan selesai dalam waktu 4 jam. Hasil tampak sebagai pita DNA dengan panjang *base pair* (bp) tertentu yang telah diketahui. Ukuran produk PCR yang diharapkan untuk influenza A/H5 adalah 358 bp dan untuk N1 adalah 615 bp. DEPKES RI menyarankan penggunaan 3 macam genom primer guna meningkatkan spesifisitas pemeriksaan RT-PCR.^{8,13,14,16}

Menemukan antibodi spesifik

Tes cepat virus (*rapid viral test*) ini digunakan untuk menemukan antibodi spesifik influenza, diantaranya: HAI, *complement fixation* (CF), *enzyme immunoassay* (ELISA guna mendeteksi Ig M anti A/H5N1), deteksi *fluorescent antibody* dan tes netralisasi. Adanya antibodi influenza di bahan spesimen tunggal tidak mengukuhkan adanya infeksi baru. Tes ini membutuhkan sampel serum akut dan penyembuhan, peningkatan titer sebesar 4× atau lebih dapat mendiagnosis influenza A. Tes serologis yang umum dipakai adalah HI, HI lebih sensitif daripada CF. Tes ini menunjukkan keterbatasan sensitivitas ketika terjadi wabah di Hongkong 1997²⁰ dan tes penetral yang lebih sensitif guna menemukan antibodi influenza dalam serum manusia. Tes mikroneutralisasi lebih disarankan, tetapi karena membutuhkan virus hidup, maka penggunaan tes ini terbatas di laboratorium berfasilitas *biosafety level* 3. Tes ini memberikan informasi tepat sebab ada kemampuan antibodi untuk menetralkan infeksi virus spesifik. Prinsip pemeriksaan dengan CF untuk



Gambar 5. Hasil PCR penderita *avian influenza* (H5N1)¹³

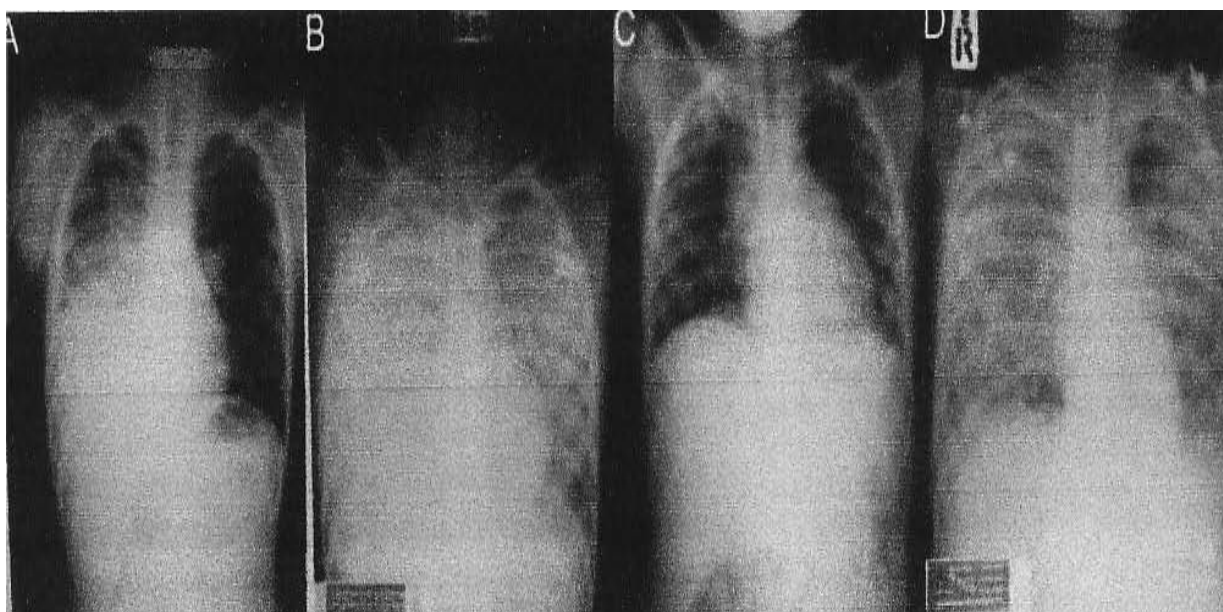
Keterangan: (A) RT-PCR spesifik H5 (358 bp) aspirat nasofaringeal menggunakan primer H5-1/H5-2. baris A, standar baris B, H5 band (358 bp); baris C, kontrol negatif; baris D, kontrol positif. (B) RT-PCR spesifik untuk H5 (229 bp) aspirat nasofaringeal menggunakan primer H5-1456/H5-1685 primer. baris A, standar; baris B, kontrol positif; baris C, H5 band penderita (229 bp).

mengetahui adanya antibodi dalam serum penderita yang dapat mengikat komplemen sehingga hemolisis eritrosit tidak terjadi. Titer yang diambil ialah hasil pengenceran serum tertinggi yang tidak menyebabkan hemolisis. Prinsip pemeriksaan deteksi *fluorescent antibody* adalah pewarna fluoresen seperti *fluorescein* dan *rhodamine* yang dapat berikatan secara dengan molekul antibodi dan dapat dilihat dengan mikroskop fluoresen. Bila hasil tes positif dan terutama disertai gejala infeksi influenza A H5N1, maka antivirus dapat diberikan. Tetapi menunda pemberian antivirus bila hasil negatif.^{1,8,9,10,13,18}

Tes laboratorik lain, jika terdapat peningkatan *aspartate aminotransferase* (AST), *alanin aminotransferase* (ALT), peningkatan serum kreatinin > 1,5 mg/dl, gangguan di sumsum tulang yang ditandai penurunan lekosit, trombosit dan eritrosit, limfopenia < 1500 sel/mm³.

Gambaran radiologis paru dapat berupa normal, *interstitial infiltrates*, *lobar infiltrates*, dan *diffuse bilateral infiltrates* pada *acute respiratory distress syndrome* (ARDS).^{16,19}

Adanya bakteri dan *polymorphonuclear* (PMN) pada pengecatan sputum, peningkatan jumlah sel darah putih lebih dari 15000/mm³ dengan atau tanpa *left shift*, mungkin menunjukkan tanda infeksi bakteri sekunder atau pneumonia (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, dan *Haemophilus influenza*).¹⁵ Pemeriksaan biopsi jaringan paru penderita memberi gambaran berupa pembentukan membran hialin dan pendarahan sepanjang ruang alveolar, infiltrasi limfosit pada daerah interstitial, pembentukan fibroblas.^{16,19} Semua hasil pemeriksaan untuk influenza A (H5N1) harus dikonfirmasi oleh *WHO collaborating centre* untuk influenza atau laboratorium rujukan yang direkomendasikan oleh WHO.¹⁴



Gambar 6. Gambaran foto dada penderita *avian influenza* (H5N1)¹⁷

Keterangan: (A) bercak infiltrat alveolar di paru bawah kanan pada hari kelima sakit, (B) ARDS pada hari kedelapan sakit, (C) infiltrat interstitial kedua paru pada hari keempat sakit, (D) ARDS pada hari keenam sakit.

PEMBAHASAN

Sampai saat ini pandemik AI masih terjadi baik dinegara berkembang maupun maju, kemungkinan transmisi dari perpindahan burung dari Negara endemis ke nonendemis.

Meskipun penyakit AI menyerang unggas, atau binatang ternak lain tapi dapat menular ke manusia selain itu antar manusia belum dapat dibuktikan.

Pemeriksaan laboratorium dapat dilakukan dengan pemeriksaan lekosit, trombosit yang dilakukan pada kasus dicurigai.

Pemeriksaan yang klinis mencurigakan AI dapat dilakukan secara bersamaan yaitu mengambil darah untuk serologi, usap tenggorok, nasofaring, dan orofaring untuk pemeriksaan RT-PCR maupun untuk uji emas kultur virus sebagai konfirmasi.

Kelemahan pemeriksaan laboratorium belum semua laboratorium rujukan dapat melakukan pemeriksaan RT-PCR.

Cara penanganan sampel harus dilakukan secara cermat agar tidak timbul hasil negatif atau positif palsu. Pemantauan di daerah endemik perlu dilakukan baik pada peternak maupun penduduk sekitarnya.

Perlu diwaspadai gejala klinik pneumonia dengan pneumonia non AI, karena gejala hampir sama atau mirip. Sudah saatnya Indonesia mengembangkan pemeriksaan RT-PCR mengingat banyak kasus AI yang sudah tersebar di sebagian daerah Indonesia atau kegunaan lain untuk diagnosis penyakit yang tidak dapat dipantau secara konvensional.

SIMPULAN

- DEPKES RI membagi diagnosis AI (H5N1) untuk manusia menjadi kasus dugaan (suspek), kemungkinan (*probable*), dan kasus terkukuhkan (konfirmasi).
- Pemeriksaan laboratorik yang sering dilakukan di Indonesia ialah tes laboratorik rutin, *rapid antigen detection*, HAI, dan perlu dikembangkan RT-PCR.
- Penyakit AI (H5N1) ialah penyakit menular yang disebabkan oleh virus influenza A H5N1 dan ditularkan oleh unggas.
- Penyakit ini menular melalui udara yang tercemar virus influenza A H5N1, yang sampai saat ini belum terbukti terdapat penularan dari manusia ke manusia.
- Penyakit AI (H5N1) terjadi di beberapa tempat secara luas hal ini diduga berasal dari migrasi burung dan transportasi unggas yang terinfeksi.
- Peklinik perlu mengetahui gambaran klinis di unggas dan manusia yang terinfeksi virus ini dan melakukan uji konfirmasi dengan pemeriksaan laboratorik sehingga dapat menegakkan diagnosis dan memberikan terapi yang memadai.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hien, TT., De Jong, M., Farrar, J., Avian influenza-a challenge to global health care structures. *N Engl J Med.* 2004, 351(23):2363-5.

2. Santoso, M., Salim, H., Alim, H., Avian influenza (flu burung). Cermin dunia kedokteran, 2005, 148:21–4.
3. Stohr, K., Avian influenza and pandemics-research needs and opportunities. N Engl J Med., Jan 2005, 352(4):405–7.
4. Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation of Human Influenza A/H5. Current concepts avian influenza A (H5N1) infection in humans. N Engl J Med. September 2005, 353(13):1374–85.
5. Hayden, FG., Influenza in Cecil textbook of medicine. Philadelphia, Saunders 22nd edition. 2004, 1974–8.
6. Bartlett, JG., Hayden, FG., Influenza A (H5N1): Will it be the next Pandemic influenza? Are we ready?. Annals of Internal Medicine 2005, 143(6):460–2.
7. Horimoto, T., Kawaoka, Y., Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. Clinical microbiology reviews, Jan 2001, 14(1):129–49.
8. Trampuz, A., Prabhu, RM., Smith, TF, and Baddour, LM., Avian influenza: A New Pandemic Threat ?, Mayo Clin Proc, 2004, 79:523–30.
9. Harper, S., Klimov, A., Uyeki, T., Fukuda, K., Influenza. Clin Lab Med, 2002, 22:863–82.
10. Ziegler, T., Cox, NJ., Influenza viruses in manual of clinical laboratory immunology, Washington, American Society for Microbiology 6th edition, 2002, 666–71.
11. Levinson, W., Jawetz, RNA enveloped viruses in Lange medical microbiology and immunology, Singapore, McGraw-Hill companies 7th edition, 2002, 235–40.
12. Nicholson, KG., Wood, JM., Zambon, M., Influenzae, Lancet, 2003, 362:1733–45. www.thelancet.com
13. WHO, Recommended laboratory tests to identify avian influenza A virus in specimens from humans, 2005 p. 1–7 http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/referencelabs/en/index.html(June 2005)
14. Hoft, DE, Belshe, RB., The genetic archaeology of influenza. N Engl J Med., Dec 2004, 351(24):2550–1.
15. Anorital, Epidemiologi avian influenza, Kumpulan makalah pelatihan penanganan sampel flu burung (*avian influenza*). Denpasar, Desember 2005.
16. World Health Organization (WHO), Recommended laboratory tests to identify influenza A/H5 virus in specimens from patients with an influenza like-illness, 19 February 2004.
17. Montalto, NJ., An office-based approach to influenza: Clinical diagnosis and laboratory testing. American Family Physician 2003, 67(1):111–8.
18. Chotpitayasunondh, T., Ungchusak, K., Hanshaoworakul, W., Chunsuthiwat, S., Sawanpanyalert, P., Kijphati, R., Lochindarat, S., Srisa, P., Suwan, P., Ossothanakorn, Y., Anantasetagoon, T., Kanjanawasari, S., Tanupattarachai, S., Weerakul, J., Chaiwirattana, R., Maneerattaporn, M., Poolsawatkitikool, R., Chokeyphalbulkit, K., Apisarnthanarak, A., and Dowell, S.F., Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004. Emerging infectious disease, 2005, 11(2):201–9.
19. Veredus laboratories. Executive summary avian influenza (H5N1) diagnostic kit.
20. Rowe, T., Abernathy, RA., Primmer, JH., Thompson, WW., Lu, Xiuhua, Lim, Wilina, Fukuda, K., Cox, NJ., and Katz, JM., Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(4):937–43.