

Identifikasi Intratipik Poliovirus

Djoko Yuwono

*Pusat Penelitian Penyakit Menular, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Departemen Kesehatan RI, Jakarta*

ABSTRAK

Dalam rangka pelaksanaan *Global Eradication Programme on Poliomyelitis* tahun 2000, pencegahan Poliomyelitis dengan imunisasi menggunakan vaksin Polio Oral Sabin telah dilakukan secara menyeluruh hampir di seluruh dunia. Akibat penggunaan vaksin Polio Oral Sabin itu adalah adanya *vaccine strain* dan *wild strain* Poliovirus bersamaan di alam, terjadinya rekombinasi antara kedua jenis poliovirus, adanya *Vaccine Associated Poliomyelitis Paralysis* (VAPP), sehingga perlu dilakukan identifikasi intratipik poliovirus untuk membedakan *vaccine strain* dan *wild strain*.

Tujuan artikel ini adalah ingin memberikan gambaran secara ringkas mengenai perkembangan metoda identifikasi poliovirus yang dilakukan dewasa ini.

PENDAHULUAN

Poliomyelitis adalah suatu penyakit menular-akut dan musiman yang menyerang pusat saraf motorik otak di bagian *grey matter*. Poliomyelitis disebabkan oleh infeksi poliovirus dan mengakibatkan terjadinya paralisis, umumnya menyerang anak balita, oleh karena itu dahulu disebut juga penyakit *infantile paralysis*. Penyakit ini diidentifikasi pertama kali oleh Landsteiner pada tahun 1901, dengan mengisolasi poliovirus dari kera, namun dari gambar-gambar di piramida diduga penyakit ini sudah ditemukan pada zaman Mesir kuno. Penyakit ini terdapat di seluruh dunia, di daerah tropik umumnya terjadi pada musim hujan, sedang di daerah subtropik lebih sering terjadi pada musim panas dan awal musim gugur. Yang menjadi masalah adalah bahwa penyakit ini dapat berakibat cacat seumur hidup, namun yang menguntungkan adalah bahwa penyakit ini kini telah dapat dicegah dengan imunisasi. Vaksin yang dipakai saat adalah vaksin oral trivalen Sabin, yang berisi virus hidup yang telah dilemahkan (*live attenuated vaccine*). Adanya vaksin ini menye-

babkan banyak negara maju bahkan beberapa negara berkembang telah mengalami penurunan angka kesakitan dan kematian akibat poliomyelitis. Dengan situasi seperti inilah maka kini WHO juga telah mencanangkan program Eradikasi Global Poliomyelitis dan pada tahun 2000 nanti diharapkan dunia sudah akan bebas poliomyelitis; bahkan di kawasan Asia Pasifik sudah ditargetkan bahwa dalam tabula 1995 sudah harus bebas poliomyelitis^(1,2).

Dengan meningkatnya penggunaan vaksin anti poliomyelitis yang *live attenuated* ini, maka akan ditemukan virus vaksin (*vaccine strain*) dan virus ganas (*wild strain*) di alam bebas, namun sebetulnya justru keadaan ini yang merupakan salah satu keunggulan penggunaan vaksin berisi virus hidup, oleh karena antara dua jenis virus tersebut saling melakukan interferensi dan mungkin juga saling melakukan rekombinasi, sehingga dapat mencegah berkembangnya virus ganas secara alami. Di sisi lain penggunaan vaksin *live attenuated* ternyata mempunyai erugian, walaupun kasusnya alianya dilaporkan 1 dalam setiap 1

juta penggunaan, yaitu terjadinya *reverse reaction*, suatu keadaan virus vaksin akan berubah kembali menjadi virus ganas, dan memang poliormorfisme dapat saja terjadi pada genom virus vaksin ataupun virus ganas oleh pengaruh faktor lingkungan^(2,3). Sebetulnya hal inilah yang merupakan masalah mengapa harus dilakukan identifikasi intratipik terhadap poliovirus, yaitu untuk mengetahui berapa besar perubahan susunan nukleotida dalam genom sehingga dapat berakibat pada terjadinya perubahan sifat antigenik poliovirus^(4,5,6).

Artikel ini bertujuan memberikan gambaran secara garis besar tentang beberapa metoda identifikasi intratipik terhadap poliovirus dan kegunaannya bagi eradikasi poliomyelitis dewasa ini.

STRUKTUR DAN ORGANISASI GENOM POLIOVIRUS

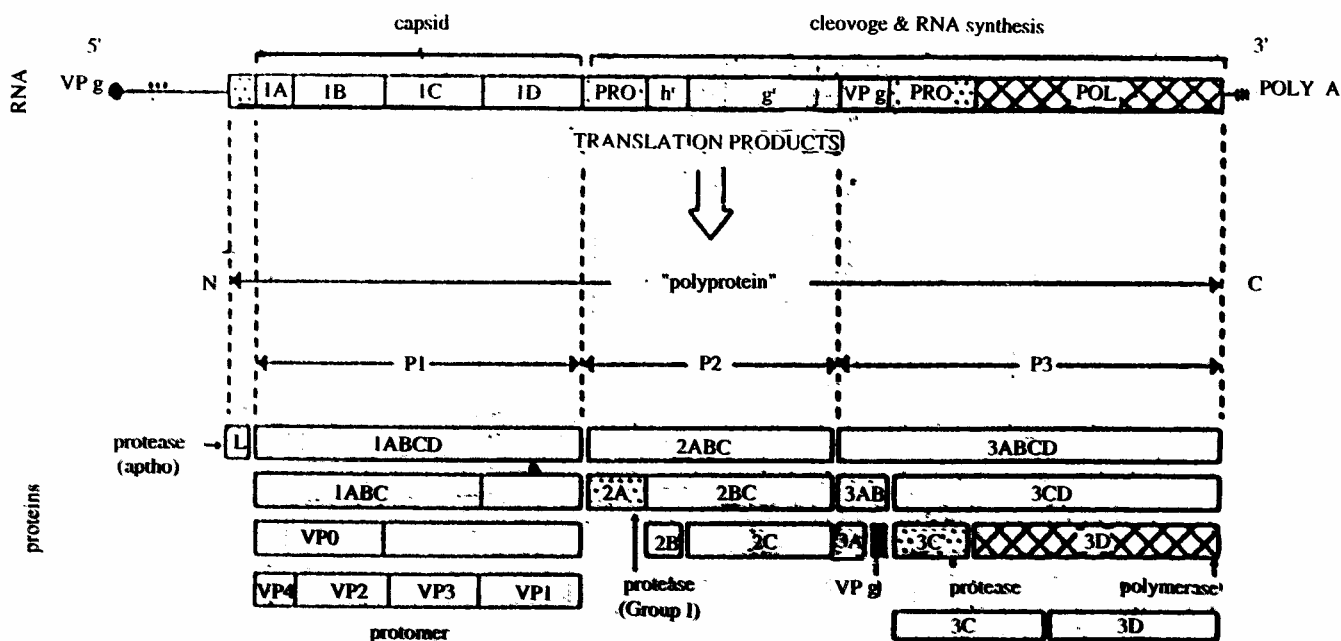
Poliovirus termasuk genus Picornaviridae, mempunyai simetri kubus ikosahedral, pentamer, dengan diameter 28–30 nm, tidak memiliki envelop. Memiliki sifat termosensitif, resisten terhadap pelarut lemak (ether, khloroform), dipengaruhi oleh guanidin. Mempunyai genom ssRNA yang bersifat polaritas positif. Genom panjangnya sekitar 75(X) bp, yang terdiri dari satu ORF (*open reading frame*) yang mengkode 3 buah protein (P1, P2 dan P3) yang masing-masing mempunyai fungsi berbeda, P1 mempunyai fungsi menyusun unit struktural virus, yang terdiri dari *Viral Protein* (VP) ada VP0: VP1: VP2 dan VP3, yang merupakan antigen determinan poliovirus. P2 mempunyai fungsi protease terdiri dari protein 2A, 2B dan 2C, serta P3 terdiri dari protein 3A, M, 3C dan 3D mempunyai fungsi *reverse transcriptase* dan polimerase. Struktur dan organisasi genom Poliovirus tipe- I (*strain* ganas Mahoney) telah digambarkan oleh

Kitamura (1981), Racaniello and Baltimore (1981)⁽⁶⁾. Toyoda dkk. juga telah berhasil menggambarkan sekuens genom Polio tipe-2 dan tipe-3 *strain* Sabin.

Perbedaan antara Poliovirus tipe-I, tipe-2 dan tipe-3 tidak begitu besar, ketiganya memiliki persamaan sekuens nukleotida antara 25%–50% (Cumakov, 1979), namun analisis dengan RFLP oleh Nomoto, dkk (1979), menunjukkan adanya perbedaan pola pemotongan dengan enzim restriksi. Hal inilah yang mendorong Toyoda, dkk (1984) melakukan sekuensing terhadap genom Poliovirus tipe-2 dan tipe-3 (Sabin), ternyata ditemukan adanya homologi sekuens sebesar 71%. Perbedaannya terletak pada 5' NCR sampai pada nukleotida 650–760 yaitu pada *region* VP4, sehingga digambarkan bahwa ke tiga tipe poliovirus mempunyai hubungan genetik yang sangat dekat^(3,7).

Atenuasi *wild virus* menjadi *vaccine virus* terletak pada perbedaan susunan beberapa nukleotida saja. Misalnya perbedaan antara Poliovirus tipe-I Sabin dan PI/Mahoney (*wild strain*) ternyata terjadi pada daerah 5' *Noncoding region* dan terletak pada nukleotida nomor 480, namun pengaruhnya hanya bersifat fenotip dan sangat lemah⁽⁶⁾. Sedangkan perbedaan antara poliovirus vaksin tipe-2/Sabin dan *wild strain* P2/Lansing terletak pada daerah 5' *Noncoding Region* dan pada *region* yang mengkode VPI (kapsid), dan 2A, 2B dan sebagian 2C (non kapsid)⁽⁶⁾. Demikian pula pada poliovirus tipe-3, dengan menggunakan *strain* Poliovirus tipe-3/Sabin dan P3/Leon diketahui bahwa attenuasi terletak pada daerah 5' *Noncoding region* pada nukleotida nomor 472 (Cytosin menjadi Urasil) dan terjadinya substitusi asam amino Serine menjadi Phenilalanin pada asam amino nomor 91 di daerah kapsid^(5,7,8). Penelitian Macadam dkk. (1991) membandingkan sifat genotip dari P2/Sabin dan P2/117 (suatu

Gambar 1. Struktur dan organisasi genom ssRNA poliovirus tipe-1 Mahoney. Menurut Kitamura (1981)



strain revertan neurovirulen) terjadi pada region 5' sampai nukleotida nomor 492, dan perbedaannya terletak pada nukleotida nomor 437 dan 481: terjadinya substitusi nukleotida Adenin menjadi Guanin⁽⁶⁾.

Pemeriksaan uji neurovirulensi pada otak kera dari *strain* virus tersebut ternyata menunjukkan bahwa perubahan susunan nukleotida tadi dapat menyebabkan terjadinya perubahan sifat non neurovirulen menjadi neurovirulen kembali; pada beberapa *strain* ditemukan telah hilangnya *region* yang dapat menyebabkan terjadinya atenuasi sehingga selamanya akan tetap bersifat sebagai wild virus⁽⁶⁾. Dengan adanya kenyataan ini terjadinya kasus *Vaccine Associated Poliomyelitis Paralysis (VAPP)* tampaknya merupakan masalah yang tidak bisa diabaikan begitu saja⁽⁹⁾.

IDENTIFIKASI POLIOVIRUS

Sampai saat ini telah diketahui terdapat tiga tipe poliovirus: Poliovirus tipe-1, *strain* Burnhilde, Mahoney; Poliovirus tipe-2, *strain* Lansing, MEF-2; Poliovirus tipe-3, *strain* Leon, Saukett, dan lain-lain.

Untuk mengidentifikasi poliovirus dapat dilakukan dengan beberapa metoda, namun pada prinsipnya dibedakan sebagai berikut :

1) Identifikasi intertipik

Untuk membedakan antara tiga tipe poliovirus tersebut dengan uji netralisasi terhadap antiserum polio, menggunakan media kultur jaringan, antara lain sel Vero (sel ginjal kera *Cynomolgus*), HEP-2 (human epithelial), RD (sel rhabdosarkoma) dan kultur jaringan ginjal kera primer (PMK).

2) Identifikasi intratipik

a) Uji fenotipik

- Uji **rct-40 marker** (*reproductive capacity at super optimal temperature*); uji ini sebetulnya hanya dipakai untuk membedakan virus vaksin dan virus ganas dalam pengujian mutu vaksin, sedangkan untuk penelitian pasca vaksinasi tidak dianjurkan. Prinsipnya adalah penghitungan titer virus pada intervensi suhu yang berbeda (biasanya pada suhu 37°C dan 40°C).

- **NaHCO₃ (d Marker)**; prinsipnya adalah pengujian berdasarkan pertumbuhan virus pada konsentrasi NaHCO₃ yang berbeda. *Strain* vaksin tidak dapat berkembang biak pada konsentrasi NaHCO₃ rendah (pH asam).

- McBride test dan Wecker test; prinsipnya adalah penghitungan titer virus setelah dinetralisasikan dengan antiserum polio poliklonal standar. *Strain* vaksin akan lebih mudah dinetralisasi.

- Uji Netralisasi terhadap antibodi monoklonal; prinsipnya adalah reaksi virus dengan suatu baterai (*pool*) antibodi monoklonal. Pola reaksi dengan setiap antiserum menunjukkan tingkat virulensi virus. Dibutuhkan paling tidak 6 tipe antibodi monoklonal, berapa persen virus yang dapat dinetralisasikan oleh antibodi tersebut menunjukkan tingkat virulensi virus.

b) Uji genotipik

- Uji Hibridisasi DNA (*finger printing DNA*); prinsipnya *probe* DNA (pelacak DNA) yang spesifik dapat disisipkan ke DNA target.

- RELP (*Restriction Fragment Length Polymorphisme*) *analysis*.

Prinsipnya harus dihasilkan dulu cDNA dengan cara mengamplifikasi cDNA target dengan PCR. PCR *products* yang terbentuk *didigest* (dipotong) dengan menggunakan aktivitas enzim endonuklease, misalnya *Dde* I, *Hae* III dan *Hpa* II. Pola restriksi (terbentuknya *band*) pada gel elektroforesis menunjukkan perbedaan tipe virus baik secara intratipik maupun intertipik.

- Amplifikasi DNA dengan PCR.

Prinsipnya adalah sintesa cDNA poliovirus dari cetakan RNA poliovirus dengan bantuan enzim *reverse transcriptase*. Kemudian dengan menggunakan primer spesifik untuk sekuens target yang diinginkan misalnya 5' NCR dengan bantuan enzim DNA *Taq polymerase* dilakukan amplifikasi sekuens target. Hasil ini spesifik untuk mengidentifikasi vaksin *strain*, hasil amplifikasi tergantung jenis primer yang dipergunakan. Diperlukan banyak primer set, paling tidak 3 primer set, untuk masing-masing tipe virus.

- Sekuens DNA analisis

PCR produk yang dihasilkan dapat dianalisis dengan menggunakan alat komputer dan hasil urutan sekuens nukleotida dapat diketahui dengan akurat.

PENELITIAN YANG TELAH DILAKUKAN

Penelitian yang telah dilakukan di berbagai negara menunjukkan betapa pentingnya pemantauan poliovirus pasca vaksinasi, seperti misalnya di Amerika Serikat dengan melakukan pemantauan selama 10 tahun dapat diketahui bahwa ternyata masih ditemukan adanya kasus paralitik VAPP, selain itu juga dilaporkan adanya kasus-kasus poliomyelitis yang disebabkan oleh poliovirus ganas yang merupakan virus impor⁽⁹⁾.

Dengan melakukan identifikasi intratipik secara molekular dapat diketahui secara tepat di mana letak perubahan genetik itu terjadi yang berakibat pada proses atenuasi *wild* virus menjadi *strain* vaksin. Hal ini akan sangat berguna untuk kemungkinan dilakukan perubahan vaksin secara rasional, teknologi pembuatan vaksin serta model dalam metodologi pengujian mutu dan keamanan vaksin^(7,10).

Penggunaan teknik konvensional umumnya dipakai untuk identifikasi intertipik dan sampai saat ini WHO masih tetap memberikan rekomendasi untuk penggunaan Uji Netralisasi terhadap antiserum poliklonal pada media kultur jaringan untuk mengidentifikasi intertipik poliovirus⁽²⁾. Sedangkan penggunaan teknik konvensional untuk identifikasi intratipik poliovirus (antara lain : McBride test, Wecker test, antibodi monoklonal, dan lain-lain) ternyata memberikan hasil yang kurang akurat dan tidak mendetail, tambahan lagi memerlukan ruang dan waktu yang perlu dipertimbangkan.

Penggunaan teknik RFLP sebetulnya kurang praktis, oleh karena harus melakukan dua kali pekerjaan, pertama harus amplifikasi DNA dengan PCR kemudian ke dua melakukan pemotongan PCR produk dengan menggunakan enzim endonuklease tertentu. Namun keuntungannya adalah pada saat amplifikasi PCR dapat dipakai suatu primer umum⁽¹¹⁾.

Penggunaan teknik amplifikasi DNA dengan PCR ternyata

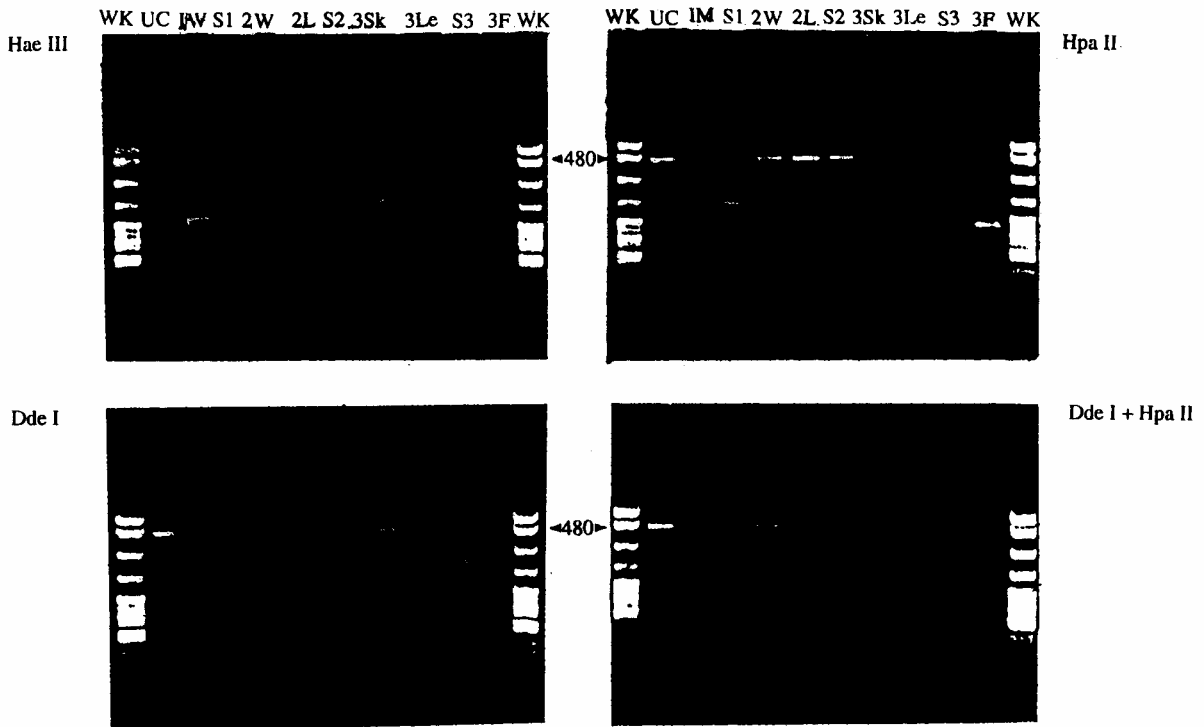
sangat membantu untuk *genotyping* poliovirus, terutama untuk diagnosis cepat. Walaupun diperlukan reagensia yang mahal, teknologi mutakhir dan tenaga terdidik yang terampil. Hasil terakhir yang diketahui adalah bahwa sampai saat ini identifikasi *genotyping* hanya dilakukan untuk vaksin *strain* saja, dengan menggunakan primer spesifik ini dapat dihasilkan produk PCR yang besarnya masing-masing 97bp (P1/Sabin); 71 bp (P2/Sabin) dan 44bp (P3/Sabin), sedangkan untuk *wild strain* belum dapat dilakukan oleh karena harus dibuat suatu desain primer spesifik untuk *wild virus*⁽⁴⁾.

Hasil penelitian di daerah kumuh di DKI Jakarta menunjukkan bahwa dengan cakupan imunisasi sebesar 87% ternyata ditemukan poliovirus tipe-1 yang merupakan strain vaksin, dengan menggunakan teknik *rct-40* marker. Adapun hasil identifikasi virus yang diperoleh adalah sebagai berikut: 3,8% poliovirus tipe-1 dan tipe-3; 20,2% enterovirus; 3,8% adenovirus dan 8,0% rhinovirus sedangkan lainnya 64,2% negatif⁽⁵⁾. Hasil penelitian di Amerika Serikat menunjukkan bahwa total ditemukan kasus VAPP sebesar 8.0/10.000.000 populasi/tahun dan masih ditemukan adanya kasus poliomyelitis yang disebabkan oleh infeksi virus ganas yang merupakan virus impor⁽⁹⁾.

PENUTUP

Identifikasi intratipik diperlukan untuk membedakan *strain* vaksin dan *wild strain* poliovirus, terutama untuk memantau

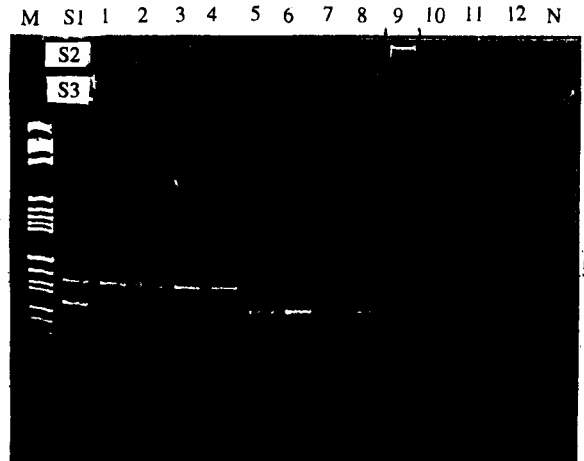
Gambar 2. Pola restriksi enzim endonuklease *HaeIII*, *DdeI* dan *HpaII* terhadap berbagai strain poliovirus hasil isolasi.



Dikutip dari : Balanant J. et al. *Virology* 1991. 184: 645-654.
 UC: uncutting, 1W: Wild str. Polio-1., S1: Sabin-1. 2W: Wild str. tipe-2. 2L: Lansing-2.; 3Le: Leon-3; S3: Sabin-3.

peredaran poliovirus pasca imunisasi. Oleh WHO dianjurkan bahwa hanya laboratorium referens saja yang perlu melakukan identifikasi intratipik poliovirus, terutama yang telah memiliki sarana laboratorium yang memadai. Sedangkan laboratorium propinsi cukup dapat melakukan isolasi dan identifikasi intertipik poliovirus saja. Dengan identifikasi intratipik secara biologi molekular dapat diketahui dengan tepat di region mana terjadi substitusi nukleotida sehingga berakibat pada terjadinya atenuasi

Gambar 3. Hasil amplifikasi DNA dengan teknik PCR terhadap RNA poliovirus Sabin strain.



Dikutip dari : Chen Fu Yang, et al. *Virus Research*. 1991. 20: 159-179.
 M: Marker. S1; S2; S3: Sabin tipe-1 97bp, tipe-2 71bp dan tipe-3 44bp.

poliovirus. Hal ini akan sangat berguna dalam melakukan perencanaan suatu komposisi vaksin secara rasional dan teknologi produksi vaksin serta metodologi pengujian mutu dan keamanan vaksin.

KEPUSTAKAAN

1. NN. Manual for The Virological Investigation of Poliomyelitis. Expanded Program on Immunization and Division of Communicable Diseases. WHO/ EPI/CDS/Polio/90.1.
2. Melnick JL. Enteroviruses. In: Virology. Fields BN. et al (eds.) 2nd ed. New York: Raven Press 1990. p. 549–598.
3. Ruckert RR. Picornaviridae and Their Replication. In: Virology. Fields BM, Knipe DM, (Eds.) 2nd. ed. New York: Raven Press 1990. p. 510–514.
4. Chen Fu Yang et al. Detection and Identification of Vaccine Related polioviruses by The Polymerase Chain Reaction. Virus Research 1991; 20: 159–179.
5. Evans DMA et al. Increased neurovirulence associated with a single nucleotide change in a non coding region of the Sabin type 3 poliovaccine genom. Nature 1985; 314: 548–553.
6. Macadam AJ et al. The 5' noncoding region of the type 2 Poliovirus Vaccine Strain contains determinants of attenuation and temperature sensitivity. Virology 1991; 181: 451–458.
7. Toyoda H et al. Complete Nucleotide Sequences of all Three Polioviruses Serotype Genomes. Implication for genetic relationship, gene function and Antigenic Determinants. J Mol. Biol. 1984; 174: 561–85.
8. Westrop GD et al. Genetic Basis of Attenuation of the Polio type 3 Oral Poliovirus Vaccine. J. Virol. 63:3; 1338–1344.
9. Strelbel PM et al. Epidemiology of Poliomyelitis in the United States One Decade after The Last Reported Case of Indigenous Wild Virus Associated Disease. Clinical Infectious Diseases, 1992, 14: 568–579.
10. Itoh H. Domestic Production of Oral Poliomyelitis Vaccine. In: Proc Internat Symp Virus Vaccine in Asian Countries, August. 25–27, 1984. p. 75–82.
11. Balanant J. The Natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphism assay. Virology 1991; 184: 645–654.
12. Djoko Yuwono. Penyebaran Poliovirus di Daerah Kumuh di DKI Jakarta. Kumpulan Laporan Penelitian Puslit. Penyakit Menular Badan Litbang Kesehatan. Departemen Kesehatan RI. 1991.



It's nice to get up early in the morning, but it's nicer to lie in bed
(Sir Larry Lauder)