

KAJIAN HISTOPATOLOGI OTAK PADA PENGUJIAN KANDUNGAN VIRUS VAKSIN AVIAN ENCEPHALOMYELITIS AKTIF

¹CYNTHIA DEVY IRAWATI, ²FERRY ARDIWAN, ¹MUSTOPA KAMAL,
²TARIM DIDI ROHADI

¹Unit Patologi

²Unit Virologi

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur – Bogor, Indonesia, 16340

ABSTRAK

Lesi histologis otak dan gejala klinis digunakan sebagai indikator untuk uji kandungan virus pada vaksin aktif *Avian Encephalomyelitis* (AE). Tujuan dari kajian ini adalah mengetahui gambaran histopatologi otak pada setiap pengenceran virus dan membandingkan deteksi infeksi virus AE berdasarkan gejala klinis dan lesi histologis. Metode yang digunakan sesuai dengan petunjuk pada FOHI 2007 vaksin AE pengujian potensi. Vaksin diencerkan secara seri (10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4}) menggunakan larutan Kalsium dan Magnesium bebas PBS. 40 telur ayam berembrio SPF umur 6 hari dari kelompok yang sama, masing-masing diinokulasikan 0,1 mL enceran vaksin ke dalam *yolk sac*. Pada hari ke-21 telur ayam divaksinasi kelompok dan kelompok kontrol diamati mortalitas telur dan adanya gejala klinis kelainan AE khas. Konfirmasi pemeriksaan histopatologi sampel otak anak ayam yang menetas dengan menggunakan pewarnaan Mayer Hematoxylin Eosin (HE), dievaluasi di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 10x dan 40x 20x. Temuan histopatologi otak menggambarkan pada pengenceran virus terendah, otak lebih banyak mengalami nekrosis. Perubahan berupa *multifocal nekrosis*, *perivascular cuffing*, *central chromatolysis*, dan degenerasi sel Purkinje pada *cerebellum* dijumpai pada semua pengenceran. Pengenceran yang lebih tinggi dari vaksin, anak ayam tidak menunjukkan gejala klinis yang jelas. Di sisi lain, lesi histologi pada anak ayam yang sangat berbeda dan didistribusikan secara luas dalam sistem syaraf pusat, terutama di otak, otak besar, otak kecil, dan *medulla oblongata*. Lesi muncul 2 minggu setelah inokulasi. *Central chromatolysis* dan degenerasi sel Purkinje, lesi histologi khas virus AE, ditemukan dalam semua ayam dengan gejala klinis dan 75 % anak ayam tanpa gejala klinis yang jelas. Prevalensi AE pada lesi histologi otak lebih tinggi dibandingkan pengamatan gejala klinis. Hasil ini menunjukkan bahwa lesi histologi otak adalah indikator yang lebih handal pada infeksi virus AE dari pada pengamatan gejala klinis.

Kata Kunci : Vaksin AE, Virus AE, Otak Ayam, Histopatologi

ABSTRACT

Histologic lesions of brain and clinical signs were used as indicator for the test for virus content of avian encephalomyelitis (AE) live vaccine. The aim of this study is to compared the detection AE virus infection based on clinical signs and histologic lesion. The method used in accordance with instructions on FOHI 2007 AE vaccine potency testing. The vaccine was diluted in series (10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4}) using a solution of calcium and magnesium-free PBS. 40 SPF embryonated chicken eggs age of 6 days from the same group, each 0.1 mL dilution vaccine was inoculated into the *yolk-sac*. On day 21 chicken eggs vaccinated group and the control group was observed egg mortality and the presence of clinical symptoms typical AE abnormalities. Confirmation histopathological examination of brain samples of chicks that hatched by using Mayer hematoxylin eosin (HE) staining, were evaluated under a light microscope with a magnification of 10x to 20x and 40x. Histopathology findings of brain showed that the lowest dilution of the vaccine made more necrosis. Changes in the form of multifocal necrosis, perivascular cuffing, central chromatolysis, and degeneration of Purkinje cells in the *cerebellum* found in all dilutions. The higher dilutions of the vaccine, chicks do not show obvious clinical symptoms. On the other hand, histology lesion of brain in chicks that are very different and widely distributed in the central nervous system, especially in the brain, *cerebrum*, *cerebellum*, and *medulla oblongata*. The lesions appear 2 weeks after inoculation. Chromatolysis center and Purkinje cell degeneration, histological lesions typical AE virus, is found in all chickens with clinical symptoms and 75% chicken without obvious clinical symptoms. The AE prevalence of histologic lesions of brain was higher than that of the clinical symptoms. These results indicate that the histologic lesions of the brain is a more reliable indicator of AE virus infection on clinical sign observations.

Keywords : AE Vaccine, AE Virus, Chicken brain, histopathology

PENDAHULUAN

Avian Encephalomyelitis (AE) merupakan penyakit virus pada ayam muda yang disebabkan oleh *Hepatovirus* dalam Famili *Picornaviridae*, virus RNA beruntai tunggal, berukuran kecil 20-30 nm, terdiri dari 4 protein VP 1-4, heksagonal tanpa amplop, yang dikenal dengan *Epidemic Tremor*. Spesies yang rentan terhadap *AE* ialah ayam, kalkun, dan burung puyuh. Gejala klinis encephalitis hanya berkembang pada ayam muda kurang dari empat minggu. Dalam kondisi lapangan penyakit paling umum menyerang pada kelompok ayam umur 1-2 minggu. Setelah hewan tampak lesu, tanda-tanda berikut terlihat : 1). Ataksia idol progresif dengan anak ayam kehilangan kontrol dari kaki, duduk di berjongkok dan jatuh ke samping, 2). Tremor pada kepala dan leher. 3). Ataksia yang berkembang menjadi kelumpuhan dan berakhir dengan kematian. Beberapa unggas dapat pulih dan dapat bertahan hidup dengan tanda-tanda klinis persisten. Sementara pada unggas dewasa, infeksi biasanya sub klinis, meskipun mungkin ada penurunan sementara produksi telur⁽¹⁾.

Transmisi virus *AE* ditularkan baik secara vertikal dan horizontal yaitu melalui telur dan melalui kontak langsung. Telur ayam betina yang terinfeksi sub-klinis akan membawa virus. Sementara telur akan menetas dan anak ayam akan terjangkit penyakit dengan gejala klinis segera setelahnya. Ayam yang terinfeksi akan melepaskan virus dalam tinja dan akan menginfeksi anak ayam yang lain melalui kontak langsung. Sampai saat burung liar belum dicurigai sebagai *reservoir*⁽²⁾.

Temuan *post-mortem* menunjukkan ayam mati *AE* tidak ada perubahan patologi anatomi yang spesifik. Pemeriksaan histologis otak dan sumsum tulang belakang mengungkapkan *Avian encephalomyelitis* dengan karakteristik terjadi degenerasi neuron, *perivaskular cuffing* dan gliosis. Temuan histopatologi pada sistem saraf pusat (SSP) memiliki nilai yang besar dalam diagnosis *AE*. Secara histologis, lesi *AE* terdiri dari dua jenis umum. Perubahan dalam SSP telah ditandai sebagai *non-purulen encephalomyelitis* disertai dengan lesi saraf ke-10, 13-15. Lesi pada organ visceral

terdiri dari agregat limfoid yang baik meningkat dalam ukuran atau frekuensi atau ditemukan di tempat-tempat yang tidak biasa. Agregat limfoid di proventrikulus dianggap *pathognomic*, terutama bila ditambah dengan perubahan saraf (*central chromatolysis*) dari lesi SSP. Differensial diagnosa penyakit *AE* adalah *Newcastle disease (ND)*, *rickettsiosis*, kekurangan vitamin E, kekurangan vitamin A, defisiensi *riboflavin*, dan *perosis*⁽³⁾.

Pengendalian dilakukan dengan memvaksinasi kelompok unggas dengan virus hidup atau dengan vaksin dilemahkan telah berhasil dilakukan. Peternak ayam yang divaksinasi pada umur 10-16 minggu. Burung yang divaksinasi pada umur 5-10 minggu dan burung puyuh pada umur 6-10 minggu yang diberikan pada *breeding pullet* sebelum layer, maka keturunannya akan terlindungi oleh maternal antibodi. Meskipun penyakit ini dapat dihilangkan dengan vaksinasi, tapi kadang-kadang dapat berulang setelah beberapa tahun kemudian⁽⁴⁾.

Tujuan dari kajian ini adalah untuk mengetahui gambaran histopatologis otak pada setiap pengenceran virus dan membandingkan deteksi infeksi virus *AE* berdasarkan gejala klinis dan lesi histologi otak.

MATERI DAN METODE

Alat dan bahan yang dipergunakan adalah vaksin *AE*, 40 telur ayam berembrio *SPF* umur hari 6 hari, spuit 1 cc, inkubator telur, desinfektan, dan alkohol 70%. seperangkat peralatan untuk pemrosesan jaringan histopatologi seperti *automatic tissue processor*, *microtom*, *embedding center*, dan *automatic hytostodyer*, serta mikroskop, *Buffer Neutral Formalin (BNF)* 10%, reagent pewarnaan *Mayer's Hematoxillin Eosin (HE)*.

Metode yang dipakai sesuai dengan petunjuk FOHI 2007 pada pengujian potensi vaksin *AE*. Vaksin diencerkan secara seri (10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4}) menggunakan larutan *PBS* bebas Kalsium (Ca) dan Magnesium (Mg). Telur ayam berembrio *SPF* umur 6 hari dari kelompok yang sama diinokulasi 0,1 mL enceran virus ke dalam *yolk sac*. Pada hari ke-21 telur ayam kelompok vaksinasi dan kelompok telur ayam kontrol diamati adanya kematian dan kelainan gejala klinis khas *AE*. Konfirmasi

pemeriksaan histopatologi sampel otak anak ayam yang menetas dengan menggunakan pewarnaan *Mayer Hematoxylin Eosin (HE)* dievaluasi dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 10x 20x dan 40x⁽⁵⁾.

HASIL

Pengujian kandungan virus vaksin *Avian Encephalomyelitis (AE)* dilakukan pada 40 telur ayam berembrio SPF umur 6 hari yang diinokulasi vaksin *AE* pada *yolk sac*. Kemudian ditunggu selama 21 hari hingga telur ayam menetas. Hasil menunjukkan bahwa kematian embrio ayam terjadi pada semua pengenceran. Pada pengenceran terendah semua embrio ayam mati. Gejala klinis berupa paralisa pada kedua kaki muncul pada pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} . Sedangkan ayam yang menetas tanpa gejala klinis terjadi pada pengenceran 10^{-4} (Tabel 1).

Tabel 1. Pengamatan mortalitas dan gejala klinis pada pengujian potensi Vaksin *AE*

Pengenceran	Tidak Menetas/ Mati	Ayam hidup	
		Paralisis pada kedua kaki	Tanpa gejala klinis
10^{-2}	10	-	-
10^{-3}	13	2	-
10^{-4}	8	3	4

Otak embrio ayam pada semua pengenceran dibuat preparat histopatologinya dengan menggunakan pewarnaan *HE*. Hasil pengamatan histopatologi otak memperlihatkan kerusakan otak terjadi pada semua pengenceran dengan tingkat kerusakan tertinggi pada pengenceran terendah. Lesi histologi otak pada embrio ayam yang diinjeksi dengan virus *AE* yang telah dilemahkan berupa *multifocal nekrosis*, *perivascular cuffing*, *gliosis*, *central chromatolysis* dan degenerasi sel *Purkinje* pada *cerebellum*. Semua ayam yang menunjukkan gejala klinis khas *AE* berupa paralisa pada kedua kaki memperlihatkan gambaran lesi histologi otak khas *AE* berupa *central chromatolysis* pada *medulla oblongata* dan degenerasi sel *Purkinje* pada *cerebellum*. Pada pengenceran 10^{-4} , 3 dari 4 ekor ayam yang tidak memperlihatkan gejala klinis memiliki lesi histologi khas *AE* seperti *central chromatolysis* pada *medulla oblongata* dan

degenerasi sel *Purkinje* pada *cerebellum* (Tabel 2 dan Tabel 3).

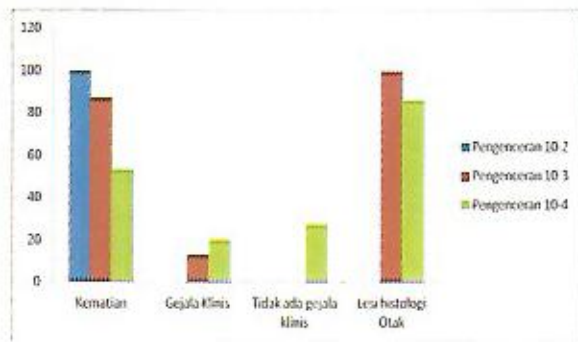
Tabel 2. Gambaran Histopatologi otak pada pengujian potensi Vaksin *AE*

No.	Pengenceran	Gambaran Histopatologi
1.	10^{-2}	Hampir 75% otak mengalami <i>degenerasi</i> , <i>nekrosis</i> , <i>perivascular cuffing</i> , infiltrasi limfosit dan <i>gliosis diffus</i>
2.	10^{-3}	<i>Multifocal nekrosis</i> , <i>perivascular cuffing</i> , banyak <i>central chromatolysis</i> pada <i>medulla oblongata</i> , dan degenerasi sel <i>Purkinje</i> pada <i>cerebellum</i> .
3.	10^{-4}	Terdapat <i>central chromatolysis</i> dan degenerasi sel <i>Purkinje</i> pada <i>cerebellum</i> , <i>perivascular cuffing</i>
4.	Kontrol	Tidak ada perubahan

Tabel 3. Perbandingan hasil uji dengan gejala klinis dan Lesi histologi khas *AE* pada otak ayam yang menetas

No.	Pengenceran	Ayam dengan gejala klinis	Ayam tanpa gejala klinis	Lesi histologi Otak khas <i>AE</i> (ekor)
1.	10^{-3}	2	0	2
2.	10^{-4}	3	4	6
JUMLAH		5	4	8

Hasil diatas menunjukkan bahwa prevalensi *AE* pada pengujian histologi otak lebih tinggi dibandingkan dengan pengamatan gejala klinis. Hal ini menunjukkan uji histologi otak memiliki sensitivitas yang sangat baik dibandingkan hanya dengan melakukan pengamatan gejala klinis. Gambaran grafik persentase kematian, gejala klinis dan lesi histologi otak khas *AE* pada pengujian vaksin *AE* terlihat pada Gambar 1. Sedangkan Gambar 1-8 merupakan temuan gejala klinis dan lesi histologi otak di setiap pengenceran pada pengujian kandungan virus Vaksin *AE* aktif.

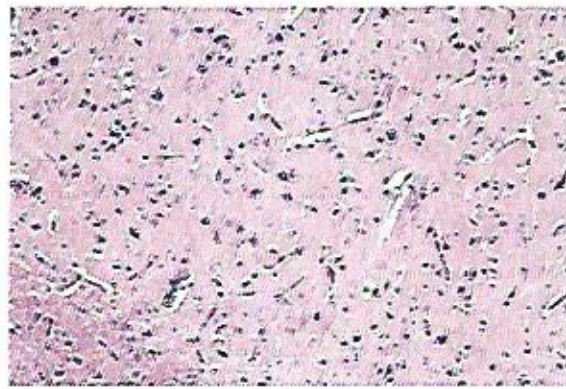


Gambar 1. Grafik persentase kematian, gejala klinis dan lesi histologi otak khas *AE* pada pengujian vaksin *AE*



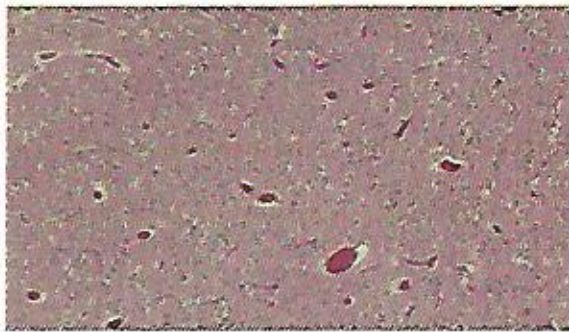
Gambar 2. Gejala klinis khas *AE* berupa paralisis pada kedua kaki Ayam *SPF* umur 1 hari (Pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4})

A. Gambaran histopatologi CNS pengenceran 10^{-2} pada embrio ayam yang mati

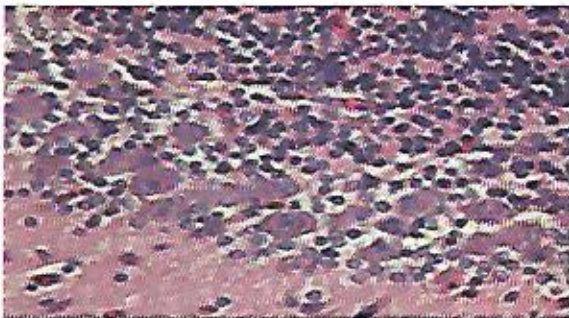


Gambar 3. A. *Cerebrum* mengalami degenerasi, infiltrasi sel mononuclear dan *gliosis*. B. *Perivascular cuffing* (tanda panah kuning)

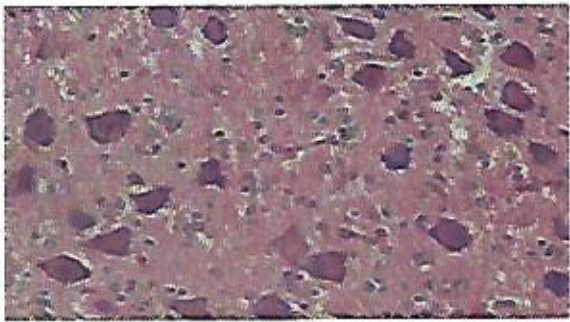
B. Gambaran histopatologi CNS pengenceran 10^{-3} pada otak ayam yang menunjukkan gejala klinis *AE*



Gambar 4. Multifokal nekrosis, hemoragi dan kongesti pada cerebrum

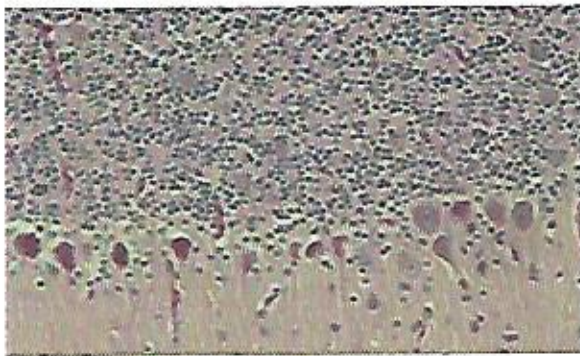


Gambar 5. Sel purkinje pada cerebellum banyak yang mengalami degenerasi

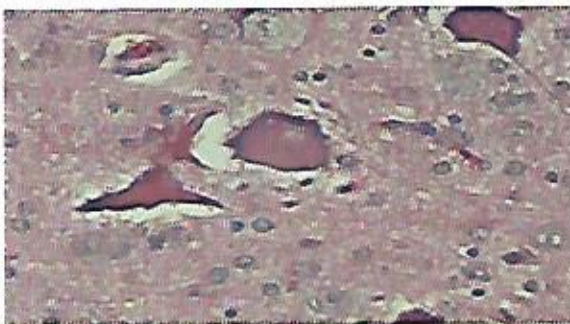


Gambar 6. Ditemukan banyak *central chromatolysis* pada *neuron medulla oblongata*

- C. Gambaran histopatologi CNS pengenceran 10^{-4} pada otak ayam yang menunjukkan gejala klinis AE



Gambar 7. Beberapa sel *Purkinje* pada *cerebellum* mengalami degenerasi



Gambar 8. Ditemukan *central chromatolysis* pada *neuron medulla oblongata*

PEMBAHASAN

Kandungan virus AE diketahui dengan menghitung jumlah kematian embrio pada setiap pengenceran. Inokulasi virus AE pada telur ayam

berembrio mengakibatkan kematian embrio pada semua pengenceran. Kematian tertinggi terjadi pada pengenceran terendah. Embrio yang mati memiliki ukuran yang lebih kecil dibandingkan dengan embrio yang tidak diberi perlakuan. Inokulasi virus dilakukan pada telur ayam berembrio umur 6 hari melalui kantong kuning telur sebanyak 0,1 mL. Hari ke -12 inokulasi embrio akan mengalami kelainan berupa degenerasi otot, kekerdilan, kaki yang memanjang, immobilitas, otak yang melunak dan kematian embrio. Telur yang hidup pada hari ke-18 memiliki kelainan yang khas. Secara histopatologi kelainan-kelainan pada syaraf berupa edema lokal, gliosis, proliferasi vaskuler dan piknosis. Pada ayam umur satu hari antigen banyak sekali ditemukan pada hati, jantung, limpa, otot kerangka dan pada jaringan syaraf pusat⁽⁹⁾.

Selain jumlah kematian pada setiap pengenceran, pengamatan gejala klinis pada embrio yang hidup juga dilakukan. Ayam yang memperlihatkan tanda-tanda klinis, tidak terdapat kelainan secara patologi anatomi, terdapat kelainan yang khas secara histopatologi pada susunan syaraf pusat. Secara patologi anatomi ayam-ayam yang terserang *Avian Encephalomyelitis* tidak mengalami kelainan yang menyolok selain kekeruhan dan kekerasan pada matanya. Pada hasil nekropsi ayam yang memperlihatkan gejala klinis dan ayam tanpa gejala klinis tidak menunjukkan patologi anatomi⁽⁴⁾.

Pemeriksaan histopatologi otak dengan pewarnaan HE memperlihatkan hasil kerusakan otak terparah pada pengenceran terendah dan berkurang secara berangsur-angsur pada pengenceran yang lebih tinggi. Temuan lesi histologi otak terdapat adanya gliosis difus maupun lokal, nekrosis, degenerasi, *perivaskular cuffing* pada *cerebrum* dan degenerasi sel *Purkinje* pada *cerebellum* serta *central chromatolysis* pada *medulla oblongata*. Beberapa penelitian mengemukakan adanya kelainan secara histopatologi pada sistem syaraf dan viscera. Pada otak dan sumsum tulang belakang terdapat *mikrogliosis*, degenerasi neuron dan infiltrasi limfosit dalam bentuk *perivascular cuffing*⁽³⁾. Penelitian lain menemukan adanya kelainan pada sistem syaraf pusat berupa *encephalomyelitis non purulen* dan *ganglionitis* pada serabut ganglia bagian dorsal. Infiltrasi *perivascular* yang menyolok banyak

ditemukan pada bagian dari otak dan sumsum tulang belakang. Lesio sel-sel glial terlihat pada lapis molekuler cerebellum, dimana sel glial cenderung memadat. Otak tengah, *nukleus rotundus*, *nukleus ovoidalis* dirusak oleh *mikrogliosis* serta *central chromatolysis* pada neuron terutama pada medulla oblongata ⁽⁶⁾. Selain itu ayam-ayam yang memiliki gejala klinis yang tidak jelas, mengalami perubahan di dalam otak tengah dan otak besar tidak jelas atau tidak ada. Sebaliknya di dalam otak kecil, terjadi pengurangan sel-sel purkinje pada cerebellum atau dikelilingi oleh sel-sel glia (*neurofagi*) ⁽⁸⁾.

Sekitar 75% ayam yang menetas tanpa gejala klinis memiliki lesi histologi khas AE yaitu central chromatolysis dan degenerasi sel purkinje. Prevalensi AE pada uji lesi histologi otak lebih tinggi dari pada pengamatan gejala klinis artinya uji lesi histologi otak lebih sensitif dibandingkan hanya dengan melakukan pengamatan gejala klinis dalam mendeteksi keberadaan virus AE. Penelitian lain juga mengungkapkan bahwa lesi histologi otak merupakan indikator yang lebih handal untuk mengathui infeksi virus AE daripada pengamatan gejala klinis ⁽⁷⁾. Sehingga dapat ditarik sebuah kesimpulan bahwa lesi histologi otak merupakan indikator yang lebih baik untuk mendeteksi keberadaan virus AE dan dapat direkomendasikan dalam pengujian kandungan vaksin AE aktif.

KESIMPULAN

Temuan histopatologi otak menggambarkan pada pengenceran vaksin AE terendah, otak lebih banyak mengalami nekrosis. Perubahan berupa multifocal nekrosis, perivascular cuffing, central chromatolysis, dan degenerasi sel purkinje pada cerebellum dijumpai pada semua pengenceran.

Lesi histologi otak yang menciri berupa central kromatolisis dan degenerasi sel purkinje pada cerebellum ditemukan pada ayam yang mengalami gejala klinis khas AE dan 3 ekor ayam tanpa gejala klinis.

Analisa hasil lesi histologi otak lebih sensitif daripada pengamatan gejala klinis sehingga lesi histologi dapat direkomendasikan untuk menjadi indikator dalam mendeteksi infeksi virus AE.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Anonimus.** 1998. Merck Veterinary Manual. Epidemic Tremor. National Publishing Inc. Edisi ke-8, Philadelphia, p 1971
2. **Anonimus.** 2007. Farmakope Obah Hewan Indonesia Sediaan Biologi. Jilid I. Edisi 3. Departemen Pertanian RI
3. **Gordon, R.F.** 1977. Infectious Avian Encephalomyelitis. In R.F Gordon . Poultry Diseases. 3rd edition Bailliere Tindall. London. Hal 113-117
4. **Gordon, R.F. and P.I W. Jordan.** 1982. Infectious Avian Encephalomyelitis. Poultry Diseases. 2 nd edition. The Language Book Society. Bailliere Tindall. London. P 135-138
5. **Lee G. Luna H.T. (ASCP).** 1968. Manual of Histologic staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third Edition. McGraw Hill Book Company.
6. **Luginbuhl R.E. and C.F. Helmboldt.** 1978. Infectious Avian Encephalomyelitis. In. M.S. Hofstad et al ed. Diseases of Poultry. 7 rd edition. Iowa State University Press. Ames Iowa P. 537-565
7. **Ohshi, K.; Senda, M.; Nakashima, N.; Nakamura, M.; Sasaki, H.; Koeda, T.** 1991: Evaluation of test for virus content of avian encephalomyelitis live vaccine based on histologic lesions in central nervous system. Annual Report of the National Veterinary Assay Laboratory (28): 3-8
8. **Resang, A.A.** 1984. Avian Encephalomyelitis Infeksiosa atau Tremor epidemik pada ayam. Patologi Khusus Veteriner Edisi ke-2. N.V. Percetakan Bali Denpasar. Hal 597-598 .
9. **Van Der Heide L.** 1980. Avian Encephalomyelitis. In Stephen B. Hitchner et. al ed. Isolation and Identification of Avian Pathogens. American Association of Avian Pathologist. New York P 77 -78