

KARAKTERISASI GALUR HIV INDONESIA DARI DONOR DARAH DENGAN HASIL UJI SEROLOGI HIV *INDETERMINATE*

Aroem Naroeni^{1*}, Hartiyowidi Yuliawuri¹, Yuliar Budi Hartanto¹, Yuyun Soedarmono²,
Budiman Bela¹, Fera Ibrahim¹

1. Insitute of Human Virology and Cancer Biology (IHVCB), Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia

2. Unit Transfusi Darah Pusat, Palang Merah Indonesia (PMI), Jakarta 10450, Indonesia

^{*}E-mail: anaroeni@yahoo.fr

Abstrak

Beberapa hasil uji serologi HIV *indeterminate* pada tes skrining darah ditemukan di Indonesia. Prosedur skrining darah yang dilakukan saat ini sesuai ketentuan yang ditetapkan oleh WHO untuk skrining darah, yaitu 3 tes uji serologi HIV selama pemeriksaan darah. Ketidaksesuaian hasil yang satu dengan yang lain didefinisikan sebagai hasil *indeterminate*. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi galur-galur HIV yang sulit teridentifikasi dari darah dengan uji serologi HIV *intermediate* dan mengevaluasi apakah galur HIV yang beredar di Indonesia mempunyai kemungkinan lolos dari sistem pendeteksian yang ada. Deteksi RT-PCR dilakukan pada 40 sampel RNA HIV dari donor darah yang mempunyai hasil uji serologi *indeterminate* dengan sebelumnya melakukan uji konfirmasi dengan menggunakan *western blot*. Deteksi RT-PCR menunjukkan bahwa sebanyak 24/32 (75%) sampel positif LTR, 4/31 (13%) positif *pol* dan 3/5 (60%) positif *env*. Amplifikasi pada daerah p24, pita-pita yang ditemukan pada sampel selalu lebih rendah dari yang diharapkan. Sekuensing dilakukan untuk mengkonfirmasi hasil amplifikasi menunjukkan bahwa perlu analisis lebih lanjut untuk mengetahui apakah perubahan ini yang menyebabkan hasil *indeterminate*.

Abstract

Characterization of HIV RNA in Blood Donor Possessing Serological Test *Indeterminate*. Indeterminate results of serological HIV test have been found in Indonesia. The screening procedure is following the prescribed by WHO for screening of blood donors which is based on 3 different serological HIV test during screening of blood donors. Discordant results are interpreted as indeterminate. This research aims to identify HIV strains that previously difficult to determine, and to evaluate whether the HIV strains present in Indonesia could pass the existing screening system. RT-PCR detection test of HIV RNA were conducted for 40 blood donors samples with indeterminate serological HIV-test after a confirmatory test using western blot. Preliminary results showed that 24/32 (75%) of the samples are positive LTR, 4/31 (12%) positive *pol* and 1/3 (33%) positive *env*. Amplification in p24 region showed that bands found have lower size than expected. Sequencing performed to confirm these findings show that further analysis is needed to determine whether this change is what behind the indeterminate results.

Keywords: env, indeterminate, LTR, pol, p24

1. Pendahuluan

Peningkatan jumlah kasus HIV yang cukup signifikan pada beberapa tahun terakhir ini menuntut penanganan yang cepat dari beberapa aspek secara simultan. Peningkatan akurasi sistem pendeteksi HIV merupakan faktor penting dalam penentuan pengobatan pasien dan pencegahan penyebaran HIV melalui skrining darah.

Tes ELISA adalah sistem diagnostik yang saat ini banyak digunakan untuk skrining selain *rapid test*. Sistem ini adalah sistem yang paling mudah dan harganya terjangkau untuk tes skrining meskipun masih banyak kekurangannya. Sistem ini mengalami penyempurnaan dari ELISA generasi I, II, III dari tahun ke tahun dan yang terakhir adalah generasi keempat. ELISA generasi IV menggabungkan deteksi antigen dan

antibodi HIV secara bersamaan.¹⁻³ Beberapa penelitian melaporkan bahwa keanekaragaman genetik dari sub tipe HIV, sub-sub tipe HIV dan *Circulating Recombinant Form* (CRF) mempengaruhi sensitivitas alat diagnostik HIV.^{4,5} Data mengenai keanekaragaman genetik dari HIV Indonesia masih sangat terbatas. Satu publikasi melaporkan adanya dominasi HIV sub tipe E dan CRF AE.^{6,7} Hal ini bisa menjadi masalah potensial dalam uji diagnostik HIV di Indonesia.

Penelitian ini ditujukan untuk mengidentifikasi galur-galur HIV yang sulit terdeteksi akibat sistem pendeteksi memperlihatkan hasil *indeterminate* dan untuk mengetahui kemungkinan adanya sub tipe atau *clade* yang khas yang beredar di Indonesia dan/atau adanya rekombinan dari virus-virus yang ada pada saat ini. Pada penelitian ini akan dianalisis *sequence* DNA dari daerah *env* (C2V3C3), LTR (U3), *pol* dan Capsid *gag* (protein *p24*). Beberapa penelitian mengambil target daerah-daerah tersebut untuk melakukan *genotyping* HIV.⁸⁻¹¹

Variasi dari daerah envelope C2V3C3 dilaporkan menentukan affinitas ko-reseptor dan tropisme dari sel.¹¹ Daerah Capsid *gag* adalah daerah yang terkonservasi pada semua jenis retrovirus yang dapat membedakan antara galur yang satu dengan yang lain. Perbedaan spesifik pada daerah LTR antar sub tipe telah ditemukan dalam studi-studi sebelumnya.^{12,13} Daerah *pol* adalah daerah gen *protease* dan *reverse transcriptase* yang berperan penting dalam infektivitas virus.

2. Metode Penelitian

Sampel berupa plasma darah dikoleksi dari kantong darah yang berasal dari berbagai daerah di Indonesia yang mempunyai hasil uji serologi HIV *indeterminate*. Galur-galur HIV yang sulit terdeteksi diharapkan dapat diisolasi dari sampel dengan kriteria tersebut di atas. Keterbatasan waktu dan biaya mengharuskan peneliti membatasi sampel dengan kriteria tersebut dan tidak memungkinkan untuk mengambil sampel yang lolos sama sekali dari sistem pendeteksi HIV yang ada (*false negatif*). RNA HIV diisolasi dari plasma kemudian dengan RT-PCR diamplifikasi sesuai dengan daerah amplifikasi yang ditentukan. RNA yang berasal dari virion menggambarkan tingkat replikasi virus yang terjadi pada saat itu sehingga secara patogenik lebih signifikan dibandingkan dengan DNA provirus yang diisolasi dari sel. Selain itu, tingkat kerusakan sekuen viral yang ada di DNA virus sangat tinggi. Meskipun begitu, teknik ini mempunyai tingkat kesulitan yang tinggi karena ketidakstabilan RNA. Produk PCR yang dihasilkan selanjutnya akan dipurifikasi sebelum dilakukan sekuensing. Tes dengan menggunakan sistem pendeteksi HIV yang ada akan dilakukan untuk mengevaluasi apakah galur HIV yang beredar di Indonesia mempunyai kemungkinan lolos dari sistem pendeteksi yang ada.

Pengumpulan sampel. Pengumpulan sampel dilakukan dengan mengambil plasma dari kantong darah PMI yang mempunyai hasil uji serologi HIV *indeterminate* yang berasal dari berbagai daerah di Indonesia. Diharapkan dari sampel tersebut dapat memberikan gambaran galur-galur seperti apa yang menyebabkan kesulitan dalam sistem pendeteksi HIV yang digunakan pada saat ini.

Ekstraksi RNA dan reaksi PCR. Viral RNA diekstraksi dari plasma dengan menggunakan *kit* yang sesuai. Hasil ekstraksi kemudian diamplifikasi dengan *one step RT-PCR* dengan menggunakan sepasang primer pertama. *Nested PCR* kemudian dilakukan dengan menggunakan sepasang primer yang kedua. Amplifikasi ini dilakukan di daerah target yaitu *env* (C2V3C3), LTR (U3), *pol* dan Capsid *gag* (protein *p24*). Primer yang digunakan dirancang sesuai dengan yang digunakan dalam penelitian sebelumnya. Selain itu dilakukan beberapa modifikasi primer dengan mempelajari sekuen-sekuen HIV yang ada di *gene bank* untuk mengantisipasi adanya mutasi dan adanya galur-galur HIV yang baru dan/atau rekombinan dari virus yang ada.

Western blot. Uji *western blot* sebagai sistem pendeteksi konfirmasi dari HIV dilakukan untuk melihat dan membandingkan hasil diagnostik standar yang dipakai pada saat ini dengan RT-PCR yang dikembangkan dalam penelitian ini.

Sekuensing DNA. Produk PCR diisolasi dari gel agarose dengan menggunakan *kit* untuk ekstraksi gel kemudian disekuensing.

Analisis data. Data yang diperoleh dianalisis dengan piranti lunak Bioedit dan ClustalX. Sekuen DNA yang diperoleh kemudian dianalisis di HIV database (www.hiv.lanl.gov dan <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) untuk menentukan sub tipe atau rekombinan HIV.

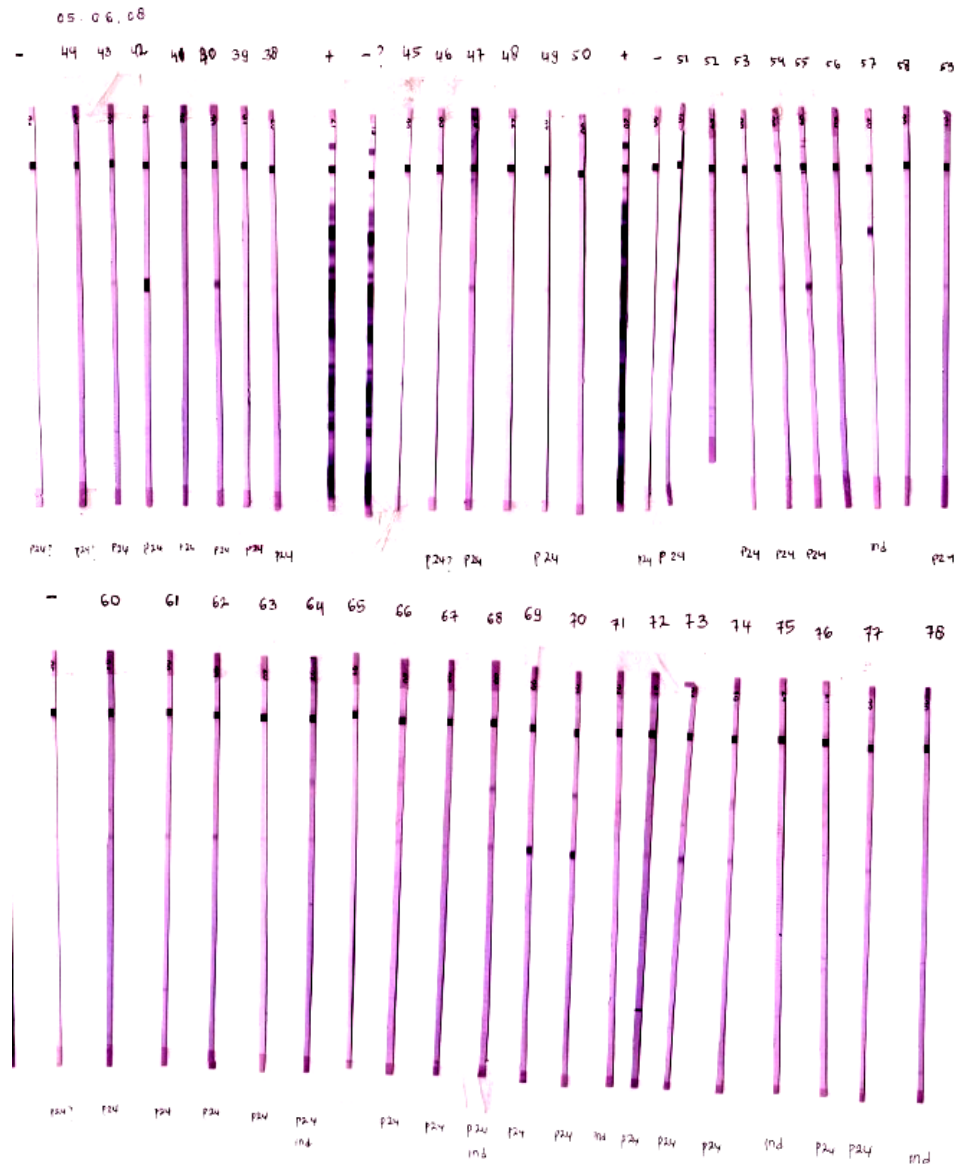
3. Hasil dan Pembahasan

Sampai dengan akhir Oktober 2008 telah berhasil dikumpulkan 70 sampel dari PMI berupa plasma darah. Sampel yang berupa kantong darah sulit diperoleh karena PMI tidak menyimpan kantong darah tetapi hanya menyimpan plasma darah karena kantong darah mudah rusak dan tidak ada cukup tempat. Sampel yang diperoleh merupakan plasma darah yang mempunyai uji serologi *indeterminate*. Dari sampel-sampel tersebut 17 sampel berasal dari Jawa Tengah, 16 sampel berasal dari Lampung, 16 sampel berasal dari Kalimantan Timur, 10 sampel berasal dari DKI, 7 sampel berasal dari Jawa Barat, 3 sampel berasal dari Sumatera Selatan dan 1 sampel berasal dari Banten.

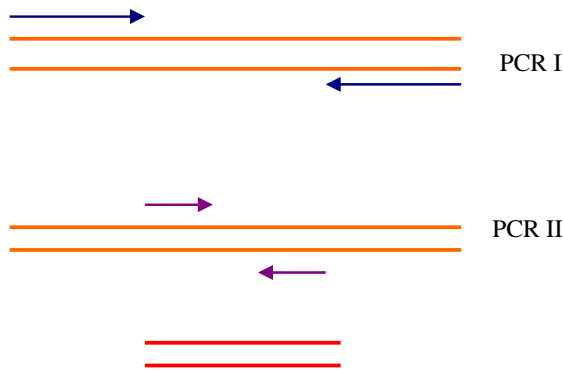
Sebelum dilakukan reaksi PCR, sampel-sampel diuji dengan *western blot* sebagai uji konfirmasi HIV. Hasil uji *western blot* memperlihatkan 30/41 (73%) dari sampel mempunyai pita *p24* sedangkan yang lain 4/41 (9,7%) negatif dan sisanya 7/41 (17%) mempunyai pita lain selain *p24*. Dari tes konfirmasi ini dapat disimpulkan bahwa 90,2% adalah *indeterminate*, yaitu sampel yang mempunyai pita *p24* dan sampel yang mempunyai pita selain *p24*. Pada saat ini sampel yang sudah diuji *western blot* ada 41 sampel (Gambar 1)

Viral RNA untuk reaksi RT-PCR diperoleh dengan mengisolasi RNA dari sampel plasma dengan menggunakan *kit* yang sesuai. Dari setiap 140 µl plasma didapatkan 60 µl RNA yang dialiquot dalam tabung

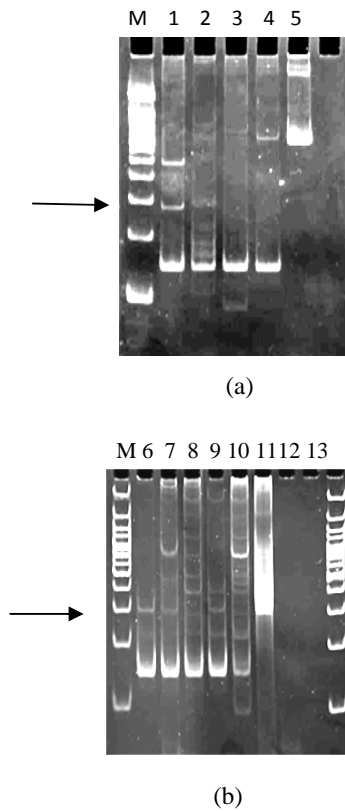
masing-masing 20 µl RNA dan kemudian disimpan di dalam freezer - 80°C. RNA ini kemudian diamplifikasi dengan menggunakan metoda *One-Step RT PCR* yang dapat mengubah RNA rantai tunggal menjadi cDNA rantai ganda kemudian diamplifikasi sekaligus dalam satu reaksi PCR. PCR menggunakan metode *nested PCR* yaitu PCR melalui 2 tahap dengan menggunakan 1 pasang primer sebelah luar dan 1 pasang primer sebelah dalam (Gambar 2). Sebelum dilakukan reaksi PCR pada semua daerah gen, semua primer yang didisain untuk mengamplifikasi daerah LTR, *env*, *p24* dan *pol* dioptimasi terlebih dahulu untuk menentukan komposisi reaksi PCR yang optimal. Optimasi dilakukan dengan menggunakan plasmid pNL 4.3 yaitu plasmid yang



Gambar 1. Hasil Uji *Western Blot* Sampel Plasma Darah PMI



Gambar 2. Bagan Nested PCR

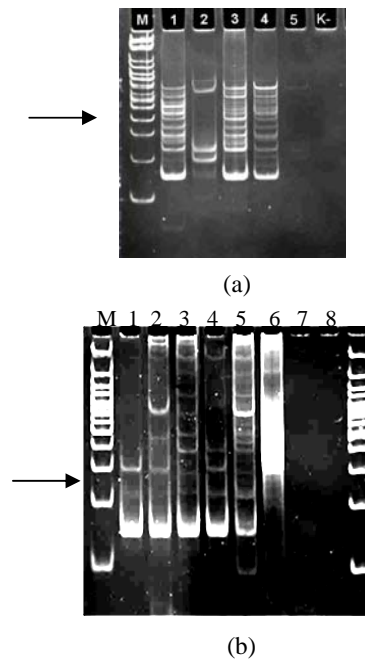


Gambar 3. (a) Hasil Reaksi PCR Tahap II LTR (291 pb) dengan Template RNA Virus dari Plasma yang Belum Dikonsentrasikan. M : Marker 100 pb. Lajur 1: kontrol positif. Lajur 2: sampel 38. Lajur 3: sampel 39. Lajur 4: sampel 40. Lajur 5: sampel 42. (b) Hasil Reaksi PCR Tahap II LTR (291 pb) dengan Template RNA Virus dari Plasma yang sudah Dikonsentrasikan. M : Marker 100 pb. Lajur 6: sampel 42. Lajur 7: sampel 40. Lajur 8: sampel 39. Lajur 9: sampel 38. Lajur 10: kontrol positif. Lajur 11: pNL 4.3. Lajur 12: kontrol negatif PCR. Lajur 13: kontrol negatif ekstraksi RNA

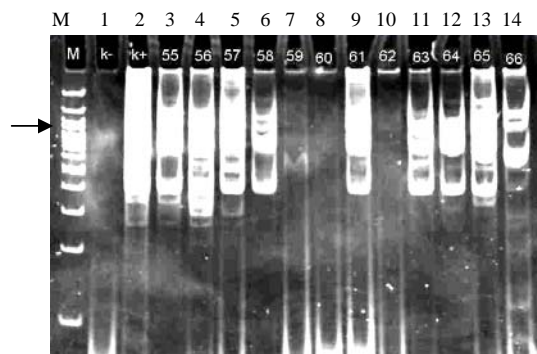
di dalamnya mengandung genom HIV lengkap dan juga menggunakan plasma pasien yang sudah dinyatakan positif terinfeksi HIV. Meskipun demikian, setelah ditemukan kondisi yang optimal untuk mengamplifikasi daerah-daerah gen tersebut dengan menggunakan plasmid pNL 4.3 dan plasma pasien, ternyata kondisi ini tidak mendeteksi virus HIV yang terdapat dalam sampel dari donor darah. Viral RNA dari sampel donor darah dapat terdeteksi setelah dilakukan sentrifugasi 20.000 xg selama 90 menit dan dikonsentrasikan 10 x dari sampel semula (Gambar 3).

Amplifikasi daerah *env* sangat sulit dilakukan sehingga hanya sedikit sampel yang sudah diamplifikasi sampai saat ini. Untuk sementara ini 20/38 (42%) sampel menunjukkan hasil positif pada PCR I (681 pb) sedangkan setelah amplifikasi kedua (500 pb) hasil yang didapatkan menjadi 1/3 (33%) (Gambar 5).

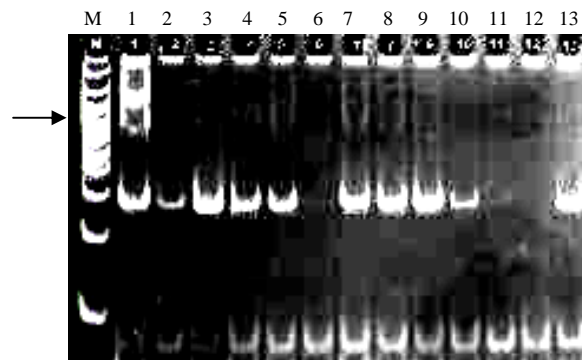
Amplifikasi daerah *pol* pada tahap pertama menunjukkan 4/31 (12,9%) dari sampel menunjukkan hasil positif di daerah yang diharapkan (306 pb) (Gambar 6).



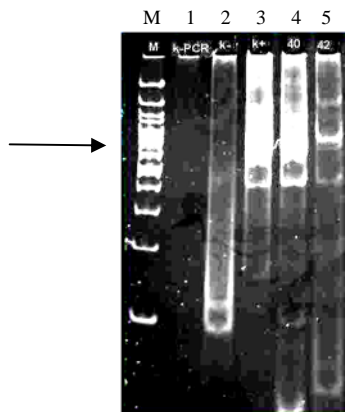
Gambar 4. (a) Amplifikasi Daerah LTR Menghasilkan 23/32 (72%) Positif pada Pita 351 pb. M : marker 100 pb. Lajur 1: kontrol positif. Lajur 2: sampel 38. Lajur 3: sampel 39. Lajur 4: sampel 40. Lajur 5: sampel 42. Lajur K-: kontrol negatif. (b) Amplifikasi Tahap Kedua 24/32 (75%) yang Menghasilkan Produk PCR yang Diharapkan (291 pb). M : marker 100 pb. Lajur 1: sampel 42. Lajur 2: sampel 40. Lajur 3: sampel 39. Lajur 4: sampel 38. Lajur 5: kontrol positif. Lajur 6: pNL 4.3. Lajur 7: kontrol negatif PCR. Lajur 8: kontrol negatif ekstraksi RNA



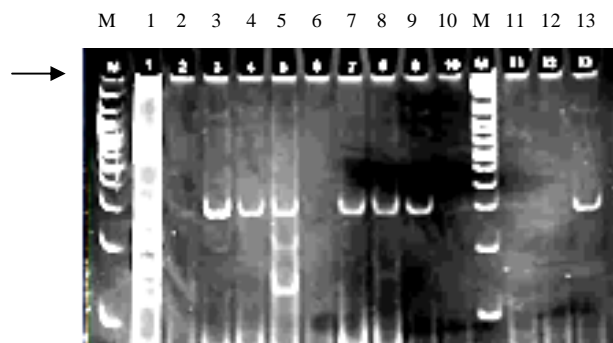
(a)



(a)



(b)



(b)

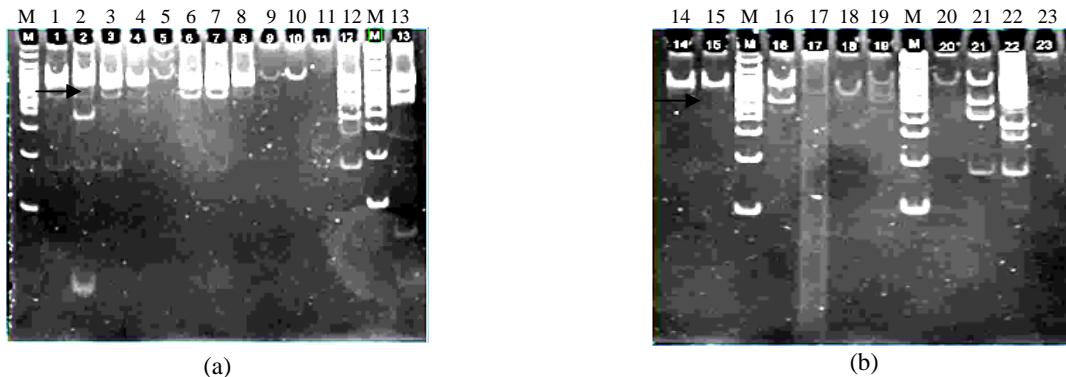
Gambar 5. (a) Amplifikasi Tahap I Envelope (681 pb). M: marker 100 pb. Lajur 1: kontrol negatif PCR. Lajur 2: kontrol positif. Lajur 3: sampel 55. Lajur 4: sampel 56. Lajur 5: sampel 57. Lajur 6: sampel 58. Lajur 7: sampel 59. Lajur 8: sampel 60. Lajur 9: sampel 61. Lajur 10: sampel 62. Lajur 11: sampel 63. Lajur 12: sampel 64. Lajur 13: sampel 65. Lajur 14: sampel 66. (b) Amplifikasi Tahap II Envelope (500 pb). M : marker 100 pb. Lajur 1: kontrol negatif PCR. Lajur 2: kontrol negatif PCR tahap I. Lajur 3: kontrol positif. Lajur 4: sampel 40. Lajur 5: sampel 42

Gambar 6. (a) Amplifikasi tahap I *p24* (676 pb). M : marker 100 pb. Lajur 1: kontrol positif. Lajur 2: sampel 49. Lajur 3: sampel 51. Lajur 4: sampel 52. Lajur 5: sampel 53. Lajur 6: sampel 54. Lajur 7: sampel 55. Lajur 8: sampel 56. Lajur 9: sampel 57. Lajur 10: sampel 58. Lajur 11: sampel 59. Lajur 12: sampel 60. Lajur 13: sampel 61. (b) Amplifikasi Tahap II *p24* (495 pb). M : marker 100 pb. Lajur 1: kontrol positif. Lajur 2: sampel 49. Lajur 3: sampel 51. Lajur 4: sampel 52. Lajur 5: sampel 53. Lajur 6: sampel 54. Lajur 7: sampel 55. Lajur 8: sampel 56. Lajur 9: sampel 57. Lajur 10: sampel 58. Lajur 11: sampel 59. Lajur 12: sampel 60. Lajur 13: sampel 61

Hasil yang berbeda ditemukan di daerah *p24*, daerah target yang pada *western blot* yang menunjukkan reaksi positif. Pada reaksi PCR yang pertama dan kedua selalu diperoleh pita-pita yang ukurannya lebih kecil dari yang diharapkan. (Gambar 7).

Produk PCR hasil amplifikasi setiap daerah gen kemudian dikonfirmasi dengan sekuensing. Hasil

sekuensing dianalisis untuk ditentukan subtipe. Hasil sementara sekuensing memperoleh persamaan sekuens dari kontrol positif (pasien positif HIV) dengan sekuens isolate HIV dari India sebagai berikut: LTR 76%, *env* 74% dan *p24* 94%. Analisis sekuensing daerah LTR dari plasmid pNL 4.3 menunjukkan kesamaan 100% dengan isolate HIV subtipe B dari Korea.



Gambar 7. (a) Amplifikasi Tahap I *pol* (306 pb). M : marker 100 pb. Lajur 1: sampel 49. Lajur 2: sampel 51. Lajur 3: sampel 52. Lajur 4: sampel 53. Lajur 5: sampel 54. Lajur 6: sampel 55. Lajur 7: sampel 56. Lajur 8: sampel 57. Lajur 9: sampel 58. Lajur 10: sampel 59. Lajur 11: sampel 60. Lajur 12: sampel 61. Lajur 13: sampel 62. (b) Amplifikasi Tahap I *pol* (306 pb). Lajur 14: sampel 63. Lajur 15: sampel 64. Lajur 16: sampel 65. Lajur 17: sampel 66. Lajur 18: sampel 67. Lajur 19: sampel 68. Lajur 20: sampel 69. Lajur 21: sampel 70. Lajur 22: kontrol positif. Lajur 23: kontrol negatif

4. Simpulan

Sembilan puluh persen sampel terkonfirmasi sebagai *indeterminate* dengan menggunakan *western blot*. Hasil RT-PCR menunjukkan 24/32 (75%) positif LTR, 4/31 (12,9%) positif *pol* dan 3/5 (60%) positif *env*. Pita-pita hasil amplifikasi DNA di daerah *p24* menunjukkan adanya pita-pita yang ukurannya lebih kecil dari yang diharapkan pada hampir semua sampel. Tiga sampel mempunyai hasil positif pada amplifikasi daerah LTR, *pol* dan *env*. Hasil-hasil ini dalam tahap konfirmasi menggunakan sekuensing untuk mengetahui adanya perubahan susunan basa pada galur-galur HIV yang beredar di Indonesia. Apabila memang terjadi, maka perlu dianalisis lebih lanjut apakah perubahan ini yang menyebabkan hasil *indeterminate* pada uji serologi HIV.

Daftar Acuan

- Dessie A, Abera B, Walle F, Wolday D, Tamene W, *Ethiop. Med. J.* 2008; 46(1): 1-5.
- Yeom JS, Ryu JB, Kang HJ, Kim S, Kim YA, Ahn SY, Cha JE, Park JW. Evaluation of a new third-generation ELISA for the detection of HIV infection. *Ann. Clin. Lab. Sci. Winter* 2006; 36 (1): 73-8
- Polywka S, Feldner J, Duttmann H, Laufs R. Diagnostic evaluation of a new combined HIV p24 antigen and anti-HIV1/2/O screening assay. *Clin. Lab.* 2001; 47(7-8): 351-6.
- Apetrei C, Loussert-Ajaka I, Descamp SD, Damond F, Saragosti S, Brun-Vezinet F, Simon F. Lack of screening test sensitivity during HIV-1 non-subtype B seroconversion. *AIDS* 1996; 14: 57-60.
- Barin F, Lahbabi Y, Buzelay L, Lejeune B, Baillou-Beaufils A, Denis F, Mathiot C, M'Boup S, Vithayasai V, Dietrich U, Goudeau A. Diversity of antibody binding to V3 peptides representing consensus sequences of HIV type 1 genotypes A to E: an approach for HIV type 1 serological subtyping. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 1996; 13: 1279-1289.
- Foley B, Donegan E, Silitonga N, Wignall FS, Busch MP, and Delwart EL. Importation of multiple HIV type 1 strains into West Papua, Indonesia (Irian Jaya) *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17(17): 1655-1659.
- Merati TP, Ryan C, Turnbul S, Wirawan DN, Otto B, Bakta IM, Crowe S. *Subtipe HIV-1 di beberapa daerah di Indonesia dan perannya sebagai petunjuk dinamika epidemic HIV*. Jurnal elektronik Universitas Udayana (online). <http://ejournal.unud.ac.id>. 2008.
- Bhanja P, Sengupta S, Singh NY, Sarkar K, Bhattacharya SK, and Chakrabarti S. Determination of gag and env subtypes of HIV-1 detected among injecting drug users (IDUs) in Manipur, India: evidence for intersubtype recombination. *Virus Res* 2005; 114: 149-153.
- Brennan CA, Lund JK, Golden A, Yamaguchi J, Vallari AS, Phillips JF, Kataaha PK, Jackson JB, and Devare SG. Serologic and phylogenetic characterization of HIV-1 subtypes in Uganda. 1997. *Aids* 11: 1823-1832.
- Sawadogo S, Adje-Toure C, Bile CE, Ekpini RE, Chorba T, and Nkengasong JN. Field evaluation of the gag-based heteroduplex mobility assay for genetic subtyping of circulating recombinant forms of human immunodeficiency virus type 1 in Abidjan, Cote d'Ivoire. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3056-3059.
- Tapia N, Franco S, Puig-Basagoiti F, Menendez C, Alonso PL, Mshinda H, Clotet B, Saiz JC, and

- Martinez MA. Influence of human immunodeficiency virus type 1 subtype on mother-to-child transmission. *J Gen Virol* 2003; 84: 607-613.
12. Jeeninga RE, Hoogenkamp M, Armand-Ugon M, de Baar M, Verhoef K, and Berkhout B. Functional differences between the long terminal repeat transcriptional promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G. *J Virol* 2000; 74: 3740-3751.
13. Naghavi MH, Schwartz S, Sonnerborg A, and Vahlne A. Long terminal repeat promoter/enhancer activity of different subtypes of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15: 1293-1303.