

## GAMBARAN SPESIFIK HISTOLOGI DAN IMMUNOHISTOKIMIA PENYAKIT JEMBRANA PADA SAPI BALI<sup>1</sup>

(The characteristic of histological and Immunohistochemical features of  
Jembrana disease in Bali cattle)

I Wayan Masa Tenaya

Balai Besar Veteriner Denpasar

### ABSTRAK

Sifat karakteristik perubahan makroskopis dan mikroskopis akibat infeksi virus penyakit Jembrana (JDV) pada sapi Bali dapat ditemukan di berbagai organ terutama di jaringan *lymphoid* seperti adanya proliferasi sel-sel limposit di luar folikel. Perubahan tersebut di duga menyebabkan terlambatnya produksi antibodi dan *delayed-immune responses*. Studi histologi dan immunohistokimia telah dilakukan untuk mengkarakterisasi lebih lanjut respon selular terhadap infeksi JDV ini. Perubahan yang mendasar selama phase akut dan pada awal phase kesembuhan di tandai dengan mengecilnya folikel-folikel dan hilangnya *germinal center* di dalam folikel-folikel tersebut, serta adanya pemekaran dan invasi sel-sel *centroblast* di daerah sel-T (*parafollicular T-cell zone*). Dengan menggunakan monoklonal anti JDV, penyebaran virus ini dapat di lacak dengan mendeteksi protein capsid JDV yang hanya terdapat di dalam sel-sel *centroblast* tersebut, sel sel mana secara morfologi mirip dengan sel-sel plasma (IgG-containing cells). Hasil ini mengindikasikan bahwa sel target dari JDV adalah sel-sel plasma dan bukan sel-sel T sebagaimana hipotesis terdahulu. Studi lebih lanjut menggunakan teknik double-immunostaining perlu dilakukan untuk mengkonfirmasi kepastian sel target JDV yang sangat penting dalam pengembangan vaksin.

**Kata kunci:** Penyakit Jembrana, JDV, sel sel *centroblast-like*.

### ABSTRACT

The principal lesions during Jembrana disease are detected mainly in the lymphoid system with a non-follicular proliferation of lymphocytes and these changes are associated with immunological effects including a delayed humoral response to the virus and transient immunosuppression. Histological and immunological studies were conducted to further characterise the cellular responses to the virus infection. The major histological changes during the febrile and early post-febrile phase were characterised by severe attenuation of follicles with depletion of the germinal centres and expansion of the parafollicular T-cell zone by proliferation of centroblast-like cells. JDV CA protein was detected primarily in these proliferated centroblast-like cells, and as they were morphologically similar to IgG-containing cells, the results suggested the main target of JDV was IgG-producing cells and not T-cells. Further studies utilising double-immunostaining are required to confirm this.

**Key words:** Jembrana disease, JDV, *centroblast-like cells*.

<sup>1</sup> Hasil penelitian merupakan bagian dari thesis S3, Universitas Murdoch 2010

## PENDAHULUAN

Virus penyakit Jembrana (JDV) adalah salah satu kelompok lentivirus yang menyebabkan infeksi akut dibandingkan kebanyakan infeksi lentivirus lainnya. Pada sapi Bali, JDV menimbulkan gejala klinis yang relatif cepat dan seringkali fatal setelah masa inkubasi pendek 5-12 hari, dengan gejala klinis demam, depresi, anorexia, pembesaran lymphoglandula (Soeharsono dkk., 1990). Selama phase akut, titer virus di dalam darah (viraemia) cukup tinggi sekitar  $10^8$  partikel virus/ml plasma (Soeharsono dkk., 1990). Perubahan haematologi meliputi *leukopenia*, *eosinopenia*, *thrombocytopenia* ringan, *a normocytic normochromic anaemia*, *hypoproteinaemia* dan uremia terkait dengan adanya lesi patologik di ginjal (Soesanto dkk., 1990). Studi patologi infeksi JDV secara komprehensif sudah dilaporkan (Dharma dkk., 1991; Dharma dkk., 1994), namun masih banyak aspek penting lainnya belum terjawab. Dalam studi terdahulu diketahui bahwa organ organ target dan lokasi sel sel yang terinfeksi JDV sudah di publikasi (Chadwick dkk., 1998) tetapi informasi lengkap tentang identitas sel-sel yang terinfeksi JDV belum diketahui secara pasti dan hal ini perlu di teliti lebih mendalam untuk mengetahui pathogenesis infeksi JDV. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui identitas sel sel target yang menjadi tempat

dimana JDV berkembangbiak. Hal ini sangat penting untuk mengetahui pathogenitas JDV pada tingkat seluler terkait upaya pembuatan vaksin *secara tissue culture*.

## MATERI DAN METODA

### Hewan percobaan

Inokulasi hewan percobaan dilakukan di Balai Besar Veteriner Denpasar dan semua uji laboratorium dilakukan di Universitas Murdoch, Australia. Sapi Bali yang digunakan dalam penelitian ini adalah betina umur sekitar 12 bulan dengan berat badan 80-100 kg, didatangkan dari pulau Nusa Penida, dimana penyakit Jembrana masih dinyatakan bebas (Hartaningsih dkk., 1994). Setibanya di Balai Besar Veteriner dimana penelitian dilakukan, sapi sapi tersebut di semprot dengan insektisida, di taruh di dalam kandang yang bebas nyamuk, diberikan pakan rumput gajah dan dedak padi serta air secara *ad libitum*. Sebelum digunakan, mereka di beri perlakuan *pre-treatment* meliputi diberikan oxytetracycline dengan dosis 5 mg/kg berat badan selama 3 hari berturut turut, obat cacing dan vaksinasi SE. Sebelum di inokulasi dengan JDV, serumnya di tes dengan uji ELISA untuk memastikan bahwa mereka masih negative penyakit Jembrana memakai rekombinan antigen capsid JDV (Burkala dkk., 1998).

### Rancangan Percobaan dan infeksi dengan JDV.

Sejumlah 7 ekor sapi di inokulasi dengan JDV kemudian 2 ekor di bunuh pada demam hari ke dua dan 5 ekor dibunuh pada hari ke 5-6 setelah demam berakhir (awal kesembuhan). Dua ekor sapi juga di inokulasi dengan bovine immunodeficiency virus

(BIV-R29) dari kelompok *bovine lentivirus* yang mempunyai kedekatan antibodi yang erat dengan JDV. BIV didatangkan khusus dari Australia untuk tujuan penelitian saja lalu semua hewan di bunuh pada hari ke 42 setelah diinokulasi (Table 1). Sejumlah 27 jaringan yang berbeda yang mewakili beberapa sistim organ diambil untuk diuji (Table.2).

**Tabel 1.**

Kode hewan percobaan dan waktu hewan di bunuh untuk pengambilan sampel.

Hewan	Jenis Virus	Waktu pengambilan sampel
CB10, CB212	JDV <sub>Tab/87</sub>	Phase demam (akut) hari ke-2 demam)
CB203, CB205, CB206, CB208, CB.210	JDV <sub>Tab/87</sub>	Phase awal kesembuhan (hari ke- 5-6 setelah demam)
CB198 ,CB199	BIV-R29	Hari ke-42 setelah inokulasi

**Tabel 2.**

Jenis organ yang diambil dari sapi percobaan..

Sistim Organ	Jenis organ/jaringan
Syaraf pusat	<i>Cerebrum</i>
Pernafasan	<i>Lung</i>
Pencernaan	<i>Pancreas, liver, rumen, reticulum, omasum, ntibody , duodenum. Jejunum, ilium and colon</i>
Kelenjar limpha	<i>Spleen, lymph nodes (prescapular, retropharyngeal, , mediastinal, mesenteric), tonsil, thymus</i>
Darah/sirkulasi	<i>Bone marrow and heart</i>
Reproduksi	<i>Ovaries, uterus dan mammary glands</i>
Urinaria	<i>Urinary bladder, kidneys and adrenal cortex</i>

Hewan di infeksi dengan inokulum yang mengandung sekitar  $10^3$  ID<sub>50</sub> JDV sesuai metode yang dilaporkan sebelumnya (Stewart dkk., 2005). Singkatnya, untuk mendapatkan dengan virus JDV<sub>Tab/87</sub>. Pada demam hari ke-2, sampel

sumber inokulum virus, se ekor sapi donor terlebih dahulu di inokulasi secara *intravena* dengan suspensi limpa 10% dari stok limpa beku dari seekor sapi yang dulunya dinokulasi darahnya diambil untuk mendapatkan plasma darah yang

sebelum di pakai harus di tes dengan uji *antigen-capture ELISA* untuk memastikan adanya JDV didalam plasma tersebut, sesuai metode sebelumnya (Stewart dkk., 2005). Sampel plasma kemudian diencerkan untuk mendapat titer virus dengan konsentrasi sekitar  $10^3$  ID<sub>50</sub>/ml dan 1 ml kemudian disuntikkan secara intravenous ke sapi percobaan. Dua ekor sapi di inokulasi dengan virus BIV strain R29 seperti dilaporkan sebelumnya (McNab dkk., 2010). Gejala klinis kemudian di amati dan di catat tiap hari sampai semua hewan di bunuh untuk pengambilan sampel.

#### **Pemeriksaan patologi anatomis dan pengambilan sampel.**

Pada saat bedah bangkai, semua jaringan segar sesuai daftar pada Table 2 di potong tipis dengan ukuran sekitar 2 x 1 x 0.5 cm lalu di fiksasi dengan 10% *neutral-buffered formalin* pH 7.5 selama 48-72 jam. Setelah jaringan di *trimming* lebih lanjut, kemudian diproses secara otomatis dengan mesin *automatic tissue processor* (Tissue Tek II) sebelum di tanam dalam *block /embedded* dengan paraffin. Untuk keperluan pemeriksaan, masing masing jaringan dalam *block* paraffin di potong setebal 4  $\mu$ m dan ditempelkan pada slide yang di lapisi *silane* (ProSciTech). Untuk pemeriksaan mikroskopis, jaringan dalam slide di warnai dengan haematoxylin dan eosin

(H&E) menggunakan metode standard. Semua slide yang telah di warnai, di periksa di bawah mikroskop *Olympus BX51 photomicroscope* dan gambarnya dipotret dengan kamera Olympus DP 70 dan diproses dengan *Olympus DP controller software*.

#### **Pemeriksaan Immunohistokimia**

##### **Sumber dan spesifikasi antibodi yang dipakai.**

Diperlukan sejumlah antibodi dalam penelitian ini meliputi: (1) antibodi monoklonal anti JDV (mAb BD2), di produksi oleh *the Animal Virology Group, Murdoch Universit*, (2) serum *Polyclonal rabbit anti-human CD3*, (3) monoklonal *mouse anti-human CD79 $\alpha$  $\gamma$* , dan (4) monoklonal *mouse anti-human MAC 387*. Antibodi (2), (3), dan (4) di beli dari perusahaan *DakoCytomation* dan (5) serum *Polyclonal rabbit anti-bovine IgG*, di beli dari *Jackson Immo Research*. Adanya reaksi ikatan antibodi-antigen di dalam jaringan di deteksi dengan *LSAB 2 system-HRP (DakoCytomation)* yang mengandung *biotin-labelled affinity* di isolasi dari *goat anti-rabbit and goat anti-mouse immunoglobulins* dilengkapi dengan streptavidin di konjugasi dengan *peroxidase* dan diwarnai dengan *chromogen 3-3' diaminobenzidine (DAB)*. Reaksi dan spesifikasi dari semua antibodi di ringkas pada Table 3.

Table 3.

Ringkasan reaksi spesifik semua antibodi dalam uji immunostokimia..

Nama antibodi	Spesifik antigen	IgG isotype	Reaksi pada sel	Konsentrasi ntibody
<i>Mab BD2</i>	<i>JDV capsid (CA)</i>	IgG1 kappa	Sitoplasma	Tidak ada
<i>Anti-human CD3 (F7.2.38)</i>	<i>T-cell</i>	Tidak ada	Permukaan	0.6 mg/ml
<i>CD79<math>\alpha\gamma</math> (HM57)</i>	<i>B-cell</i>	IgG1 kappa	Sitoplasma	0.25 mg/ml
<i>MAC387</i>	<i>Macrophage</i>	IgG1 kappa	Sitoplasma	0.375 mg/ml
<i>Rabbit anti-bovine IgG</i>	<i>Whole molecule bovine IgG</i>	Whole IgG	Sitoplasma	2.4 mg/ml

### Pewarnaan Immunohistokimia (Immunoperoxidase)

Pewarnaan immunohistokimia (*immunoperoxidase*) pada jaringan dikerjakan dengan metode yang sudah di publikasi (Niku dkk., 2006) dengan sedikit modifikasi sebagai berikut: objek glass yang berisi 2 potongan yang identik (*sequential tissues sections*), satu untuk reaksi positif dan satu reaksi negatif, dipanaskan 3 kali masing masing 3 menit memakai *hair dryer* untuk perlekatan jaringan dan didinginkan 3 menit pada setiap pemanasan. Setelah dingin, jaringan dicelupkan ke dalam xylene jenuh untuk melepaskan lapisan paraffin kemudian proses penghilangan air dari dalam jaringan dilakukan dengan mencelupkan kedalam alcohol berkonsentrasi berbeda (absolute, 95%, 70%) dan terakhir dengan air. Jaringan kemudian di taruh di dalam wadah khusus (*plastic jar*) yang berisi larutan Tris-EDTA (10

Mm Tris, 0.1 Mm EDTA, Ph 9.2) lalu di *microwave* (2 kali selama 4 menit pada 805 Watt dan 2 kali selama 4 menit pada 230 Watt dengan interval jeda 1 menit pada setiap proses. Jaringan lalu didinginkan di dalam air keran pada suhu ruangan. Untuk meniadakan aktifitas *endogenous peroxidase*, jaringan di tetesi 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam air selama 5 menit, dan di cuci 3 kali dengan Dh20. Kemudian, 200  $\mu$ l *primary antibody* yang telah dilarutkan dengan PBS berisi 10% *new born calf serum* (NBCS) ditetaskan di bagian positif objek glass dan hanya PBS dengan 10% NBCS ditetaskan di bagian reaksi negatif. Pengenceran dan lamanya inkubasi dari setiap antibodi sudah ditetapkan berdasarkan serangkaian uji optimalisasi sebelumnya sebagai berikut: Mab BD2 1:200 di inkubasi selama 30 menit, *CD79 $\alpha\gamma$  (B-cell marker)* 1:200 di inkubasi 15 menit, *anti-human*

*CD3 (T-cell marker)* 1:50 di inkubasi 30 menit, dan *anti-bovine IgG* 1:1000 dan diinkubasi 30 menit. Setelah di inkubasi dengan antibodi primer, slide di cuci 3 kali dengan PBS. Kemudian, dua tetes *biotinylated-secondary antibody* ditambahkan di atas slide dan di inkubasi 15 menit. Slide lagi di cuci 3 kali dengan PBS, lalu dua tetes *antibodi-labelled streptavidin* ditetaskan di atas slide lalu di inkubasi 10 menit pada suhu ruangan. Slide lagi di cuci 3 kali dengan PBS, dan reaksi warna dimunculkan dengan penambahan 2 tetes 3-3'diaminobenzidine (DAB) selama 3-5 menit. Kemudian slide di cuci dengan Dh20, dan di konterstain dengan H&E. Akhirnya slide di dehidrasi di dalam ethanol absolute, di bilas dengan xylene dan secara permanen di mounting sebelum di periksa dengan mikroskop cahaya. Reaksi untuk kontrol negatif dilakukan dengan menghilangkan salah satu antibody primer atau antibodi sekender dan atau dengan penambahan antibodi primer/sekender yang tidak relevan.

### HASIL

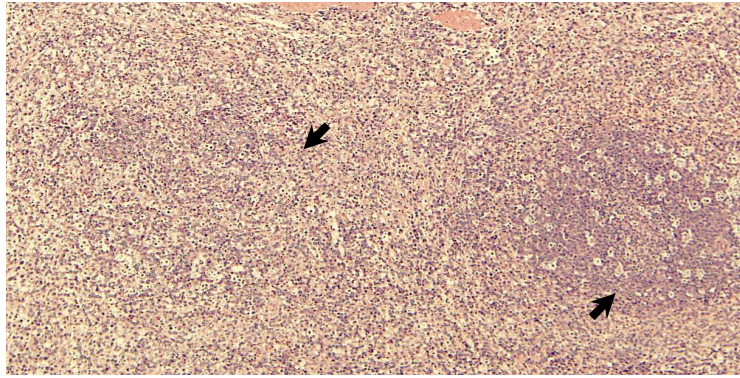
Dalam penelitian ini gambaran spesifik histologi dan imunohistokimia sengaja dimunculkan untuk tujuan: (1) konfirmasi konsistensi patogenesis infeksi JDV dan

dampak infeksi BIV pada sapi Bali dan (2) untuk membandingkan dinamika sel sel yang terlibat selama infeksi berlangsung, terkait pelacakan terhadap sel sel spesifik yang menjadi target akhir JDV.

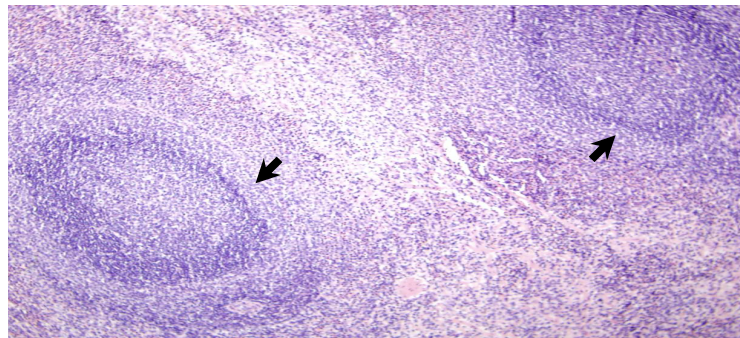
### Perubahan histopatologi selama phase demam

Dengan pewarnaan H&E dan pemeriksaan mikroskopis, jaringan dari sapi pada saat demam hari ke dua menunjukkan perubahan yang khas gejala penyakit Jembrana. Di dalam limpa, hampir semua folikel folikel menghilang/kabur dan *germinal centre* nya hilang. Daerah marginal (*light zone*) dan daerah sekitar *periarterolar lymphoid sheath* di penuhi oleh populasi sel bundar pleomorpik (Gambar 1A). Gambaran ini tidak ditemukan pada jaringan sapi kontrol yang di infeksi BIV (Gambar 1B). Banyak sel sel bundar pleomorpik menginfiltrasi daerah sel sel T (pulpa merah), bergerombol di sekitar arteri *penicilliary* dan tersebar di daerah pulpa merah. Jumlah sel sel pleomorpik dengan derajat ringan juga ditemukan dengan warna sitoplasma berwarna merah dengan kromatin yang aneh dan besar menyerupai sel sel *etroblast* (Gambar 2). Juga ditemukan banyak badan badan apoptotik dan sel sel mitotik. Daerah marginal (*parafollicular zone*) dibatasi oleh lingkaran sejumlah sel sel netropil.

**A**

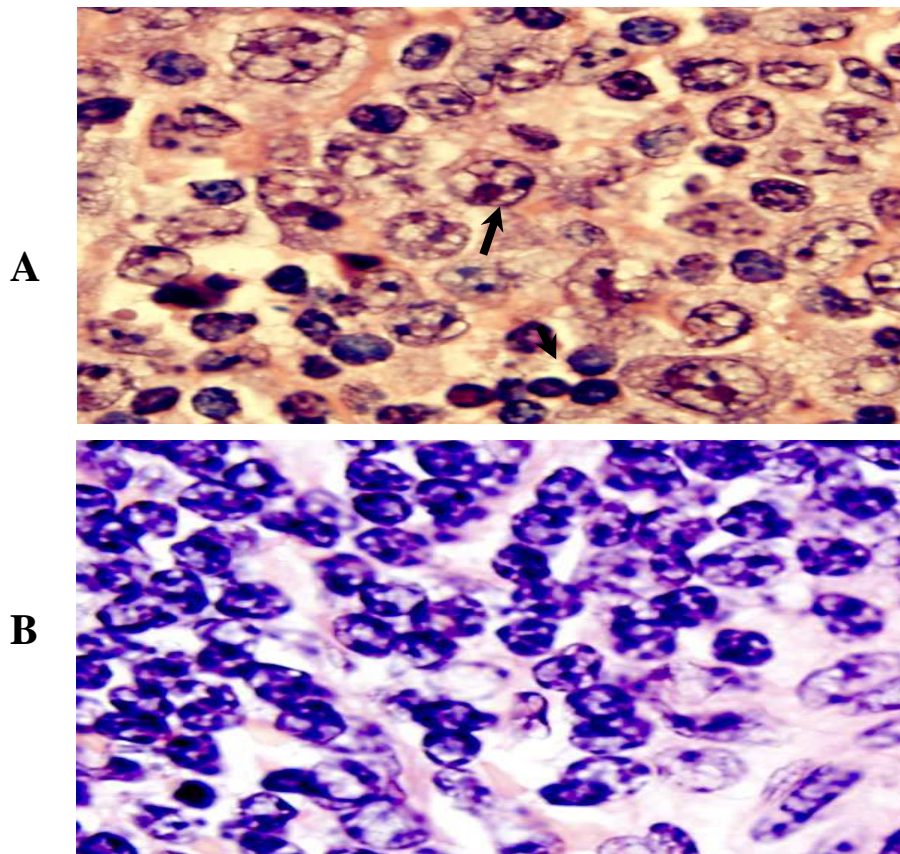


**B**



**Gambar 1.**

Jaringan limpa dari seekor sapi Bali terinfeksi JDV pada demam hari ke 2 (A) dan sapi kontrol negatif, BIV (B). Folikel mengalami deplesi dan *germinar center* menjadi kolap/kabur. *Germinar center* yang normal dan yang mengalami deplesi ditunjukkan dengan tanda panah. Diwarnai H&E, pembesaran 10X.



**Gambar 2.**

Daerah *parakortec* jaringan limpa yang di infeksi JDV pada demam hari ke 2 (A) dan sapi kontrol negatif, BIV (B). Ada banyak sel sel *pleomorphic centroblast-like* pada jaringan yang terinfeksi JDV, bercampur dengan sedikit sel sel limposit kecil. Tanda panah panjang menunjukan contoh sel sel *pleomorphic centroblast-like* dan tanda panah pendek menunjukan sel sel limposit kecil. Di warnai H&E, pembesaran 100X.

Kelenjar kelenjar limfe (*lymph nodus*) dari tempat anatomi yang berbeda juga menunjukan perubahan yang sama walaupun derajat keparahan yang sedikit berbeda. Di dalam hati, daerah portal di penuhi infiltrasi sel sel mononuclear, juga adanya banyak sel sel *pleomorphic centroblast-like*. Di dalam ginjal, di sekitar pembuluh darah ukuran medium pada daerah *interstitium* di temukan infiltrasi sel sel mononuclear. Di dalam jantung di beberapa sekitar pembuluh darah

ditemukan adanya infiltrasi sel sel mononuclear. Di dalam sumsum tulang ditemukan deplesi cukup berat di jaringan *haematopoietic*, dengan sedikit neutropil bersegmen. Ada juga sedikit kelompok sel sel *pleomorphic centroblast-like* di daerah *sinusoids*. Di dalam thymus ada kerusakan/depleksi kortek disertai kehilangan sel sel *thymocyte* di daerah kortek, menyebabkan kolapnya jaringan stroma. Di dalam paru-paru ada ekspansi *alveolar septa* oleh eksudat

berfibrin, dengan beberapa sel sel *pleomorphic centroblast-like*. Di dalam pancreas ditemukan adanya leukosit di dalam lumen pembuluh darah besar dan beberapa dari sel sel tersebut adalah sel sel *pleomorphic centroblast-like*. Tidak ada perubahan yang signifikan pada otak, uterus, kelenjar adrenal, ovari, kelenjar mammae, visica urinaria atau di saluran pencernaan.

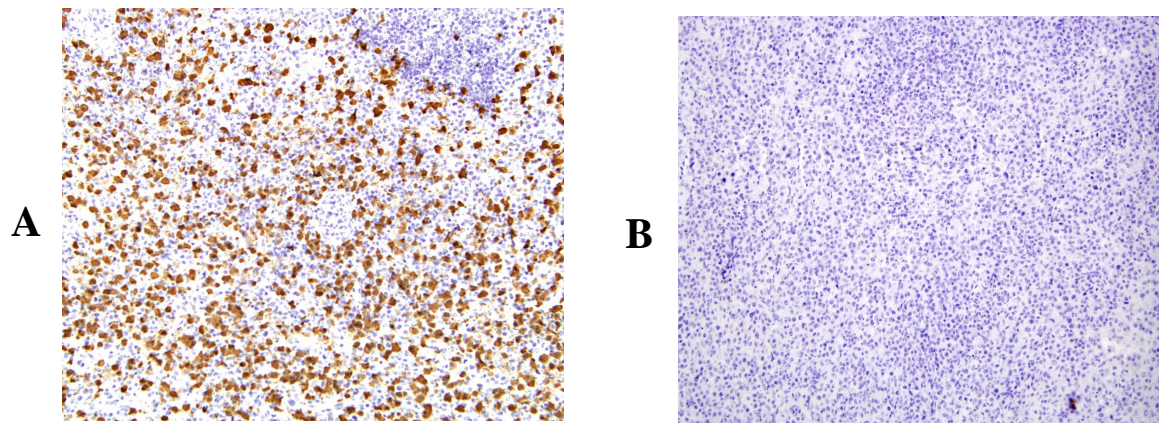
### **Perubahan histologi pada awal kesembuhan.**

Sekitar satu minggu setelah berakhirnya demam, sapi yang terinfeksi JDV tidak menunjukkan perubahan makroskopis (patologi anatomis) yang berarti tetapi secara mikroskopis masih ditemukan abnormalitas dengan derajat yang sama pada semua hewan. Di dalam limpa, jumlah folikel masih sedikit dan *germinal center* nya masih kabur. Daerah *marginal zone* dari folikel dengan infeksi berat, di penuh sel sel *centroblast-like* dan badan makrophage. Daerah *periarteriolar lymphoid sheaths* di penuh sel sel limposit kecil bercampur dengan sedikit sel sel *centroblast-like*, sel sel apoptosis dan badan makrophage. Di daerah parafollicular ditemukan netrofil yang menyebar merata. Kondisi kelenjar limfe pada hewan yang baru sembuh hampir sama dengan pada saat demam. Daerah *germinal centre* masih mengalami deplesi dan *mantle zone* dikelilingi oleh barisan sel sel *pleomorphic centroblast-like*. Akan tetapi perbedaan yang menonjol adalah daerah

*corticomedullary junction* menjadi tidak jelas akibat ekspansi daerah *paracortex* oleh sel sel limposit kecil yang bercampur dengan badan badan makrophage yang mendesak dan menggantikan posisi sel sel *centroblast-like* terutama di sekitar folikel dan wilayah *medullary cords*. Daerah *germinal center* dari beberapa folikel pada kebanyakan kelenjar limpa dipenuhi oleh sel sel *centroblast-like*, hal mana menunjukkan reaksi awal hiperplasia.

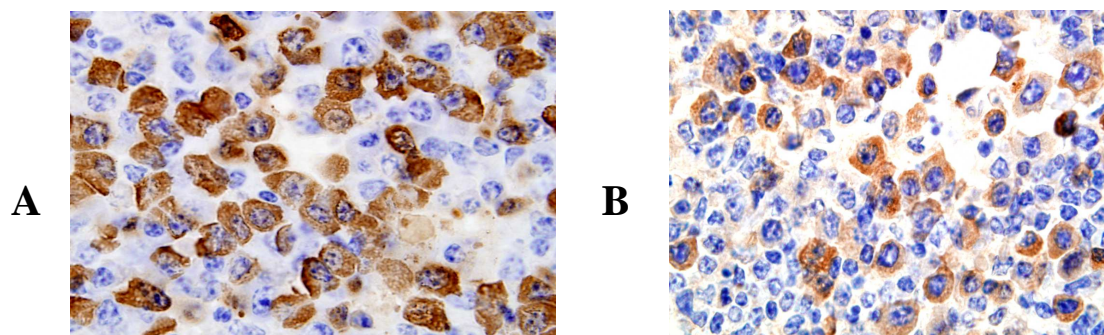
### **Identifikasi sel sel positif JDV pada jaringan selama phase demam (akut).**

Keberadaan virus Jembrana (JDV) di identifikasi dengan melacak protein capsid JDV di berbagai organ/jaringan. Di limpa, sel sel yang positif terdeteksi pada semua hewan sejak demam hari ke 2 dengan intensitas yang sama (Gambar 3A) dan tidak terdeteksi pada organ sapi kontrol yang diinfeksi BIV (Gambar 3B). Di dalam organ ini, banyak sel sel *pleomorphic* dengan pewarnaan sitoplasmik yang kuat tersebar di daerah *red pulp*. Sel sel yang positif mengandung capsidprotein JDV adalah sel sel *pleomorphic* besar dengan inti di pinggir menyerupai sel sel plasma (*IgG containing cells*) dan menunjukkan warna hitam kecoklatan di daerah sitoplasmanya (Gambar 4A). Bentuk morfologi dan lokasi sel sel yang positif tersebut mirip dengan bentuk dan lokasi penyebaran sel sel plasma / sel sel yang mengandung IgG, *IgG containing cells* (Gambar 4B).



**Gambar 3.**

Jaringan limpa dari seekor sapi terinfeksi JDV pada demam hari ke 2 (A) dan sapi normal (B), direaksikan dengan antibodi monoklonal anti capsid JDV. Sel sel yang mengandung capsid protein JDV (warna coklat) hanya ditemukan pada jaringan sapi terinfeksi JDV (A) dan tidak pada jaringan sapi terinfeksi BIV (B). Pewarnaan/reaksi immunohistokimia, pembesaran 10X.



**Gambar 4.**

Jaringan limpa dari seekor sapi terinfeksi JDV pada demam hari ke 2 direaksikan dengan antibodi monoklonal anti capsid JDV (A) dan dengan antibodi poliklonal *anti bovine IgG* (B). Sel sel yang positif JDV secara morfologi sangat mirip dengan sel sel plasma/ sel yang mengandung IgG, yaitu selnya besar, memiliki sitoplasma besar dengan inti sel di pinggir. Pewarnaan/reaksi immunohistokimia, pembesaran 100X.

Hasil pengujian tentang organ/jaringan lainnya diringkas penyebaran JDV pada pada Tabel 4.

**Table 4.**

Ringkasan distribusi JDV di berbagai organ/jaringan dari 2 hewan (CB10 and CB212) pada hari demam ke 2 yang bereaksi dengan antibodi monoklonal anti JDV.

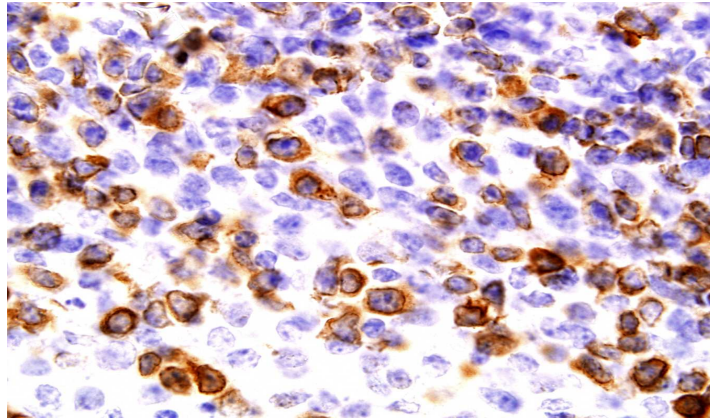
Sistem organ	Type jaringan	Hasil
<i>Lymphoid</i>	<i>Spleen</i>	+++
	<i>Superficial lymph node</i>	++
	<i>Mesenteric lymph node</i>	++
	<i>Retropharyngeal lymph node</i>	++
	<i>Mediastinal lymph node</i>	++
	<i>Thymus</i>	++
	<i>Tonsil</i>	+
<i>Respiratory</i>	<i>Lungs</i>	++
<i>Digestive</i>	<i>Rumen</i>	+
	<i>Omasum</i>	+
	<i>Abomasum</i>	+
	<i>Intestine</i>	+
	<i>Liver</i>	+
	<i>Pancreas</i>	+
<i>Urinary</i>	<i>Adrenal cortex and kidneys</i>	+
<i>Haematopoietic/circulation</i>	<i>Bone marrow and heart</i>	+
<i>Reproductive</i>	<i>Ovaries and uterus</i>	+
<i>Nervous</i>	<i>Cerebrum</i>	-

Positif (+) and negatif (-) reaksi di nilai berdasarkan pengamatan secara kualitatif dengan melihat sekitar 100 sel sel positif dalam 1 lapang pandang mikroskop pembesaran 20X : +++, reaksi sangat kuat ( $\geq 100$  sel tiap 1 pandang mikroskop); ++, reaksi kuat (50-100 sel tiap 1 pandang mikroskop); +, reaksi lemah ( $\leq 50$  sel tiap 1 pandang mikroskop).; - ,tidak ada sel positif.

#### Identifikasi sel sel B pada jaringan selama phase demam (akut)

Pada limpa, sel sel B diidentifikasi menggunakan marker sel B, CD79 $\alpha$  $\gamma$  yang memproduksi warna coklat tua di dalam sitoplasma sel sel pleomorfik/sel sel *centroblast-like* yang berlokasi di daerah *marginal zone* dan *periarteriolar lymphoid*

*sheath* limpa (Gambar 5). Di dalam kelenjar limfe dan tonsil, sel sel pleomorfik/sel sel *centroblast-like* juga terdeteksi di sekitar dan di dalam folikel, memenuhi bagian *cortico-medullary* dari *medullary cords* dan *paracortex*. Sel sel yang sama juga terdeteksi di organ lain: hati, ginjal, hati dan sumsum tulang



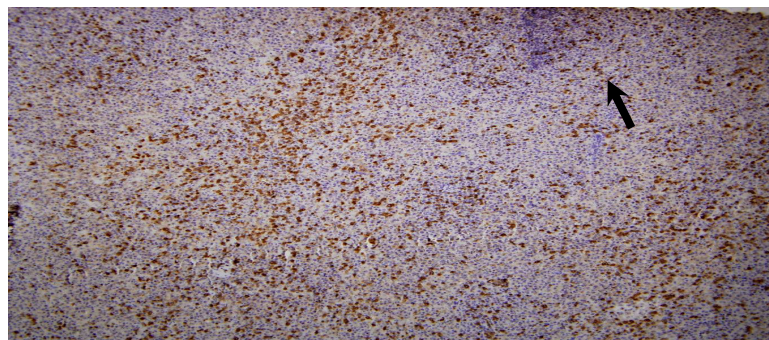
**Gambar 5.**

Jaringan limpa dari seekor sapi terinfeksi JDV pada demam hari ke 2 direaksikan dengan antibodi CD79 $\alpha$ cy (a B-cell marker). Catatan: sel sel yang positif CD79 $\alpha$ cy menunjukkan warna coklat tua di daerah sitoplasmanya. Pewarnaan/reaksi immunohistokimia, pembesaran 40X.

#### Identifikasi sel sel T pada jaringan selama phase demam (akut)

Di dalam limpa, sel sel T terdeteksi dengan mengidentifikasi adanya reaksi molekul CD3 terutama pada permukaan sel. Tidak seperti

keadaan normal, sel sel T (CD3) ini jumlahnya sangat jarang di daerah *periarteriolar lymphoid sheaths* akibat di penuhi oleh sel sel B *pleomorphic centroblast-like* (Gambar 6). Gambaran yang sama juga ditemukan di kelenjar limfe dan tonsil



**Gambar 6.**

Jaringan limpa dari seekor sapi terinfeksi JDV pada demam hari ke 2 direaksikan dengan antibodi CD3 (*T-cell marker*). Catatan: sel sel yang positif CD3 jumlahnya sangat jarang (dibandingkan dengan kondisi reaksi setelah kesembuhan) menunjukkan reaksi coklat di daerah *periarteriolar lymphoid sheaths* dekat folikel yang mengalami deplesi (panah). Pewarnaan/reaksi immunohistokimia, pembesaran 10X.

### Identifikasi sel sel monosit/makrophage pada jaringan selama phase demam (akut)

Sel sel monosit/makrophage diidentifikasi memakai antibody MAC387. Akan tetapi mayoritas sel sel yang positif adalah monosit berdasarkan segmentasi nukleusnya. Secara umum sel sel ini terdeteksi berupa lingkaran di sekitar daerah *follicular mantle zone* di dalam limpa dan lumen pembuluh darah. Penyebaran sel sel monosit/macrophage ini sangat berbeda dengan sel B, sel T dan sel sel positif JDV.

### Identifikasi sel sel positif JDV pada jaringan pasca demam (awal kesembuhan)

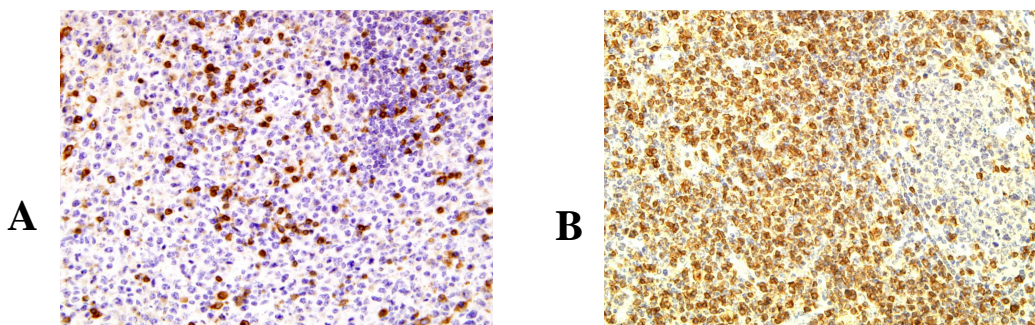
Tidak seperti pada saat demam, sel sel positif protein JDV tidak lagi terdeteksi pasca demam, di awal kesembuhan

### Identifikasi sel sel B dalam jaringan selama phase demam (akut)

Sangat sedikit jumlah sel sel B ditemukan di dalam folikel dan ada sedikit sel sel *centroblast-like* di sekitar folikel dan di sekitar *periarteriolar lymphoid sheaths* dan *red pulp* limpa. Di jaringan kelenjar limfe, sel sel B ditemukan di dalam *mantle zone* folikel dan ada sedikit sel sel *centroblast-like cells*

### Identifikasi sel sel T pada jaringan pasca demam (awal kesembuhan)

Jumlah sel sel T (CD3) di daerah *periarteriolar lymphoid sheaths* dari limpa dan daerah para kortek kelenjar limfe sangat banyak yang menginfiltrasi dan menggantikan lokasi sel sel *centroblast-like*. Berbeda dengan phase akut dimana sangat jarang sel sel T ditemukan (Gambar 7 A), phase pasca demam jumlah sel sel T (CD3) menjadi berlipat ganda dalam organ ini (Gambar 7B).



Gambar 7.

Jaringan kelenjar limfe *mesenteric* dari se ekor sapi terinfeksi JDV pada demam hari ke 2 (A) dan pasca demam/kesembuhan (B) direaksikan dengan antibody CD3 (*T-cell marker*), menunjukkan perbedaan jumlah sel sel T. Sangat sedikit jumlah sel sel T ditemukan disekitar folikel pada phase akut (demam) dibandingkan dengan phase pasca demam (kesembuhan). Catatan: sel sel yang positif CD3 ditunjukkan dengan reaksi coklat Pewarnaan immunohistokimia, pembesaran 10X.

### Identifikasi sel sel monosit/makrophage pada jaringan pasca demam (awal kesembuhan).

Tidak ada perbedaan jumlah dan penyebaran sel sel monosit/makrophage selama demam dengan pasca demam.

## PEMBAHASAN

Dalam studi ini gejala klinis khas penyakit Jembrana (Soeharsono dkk., 1995a; Soesanto dkk., 1990) dapat dimunculkan kembali dengan infeksi JDV<sub>Tab/87</sub>. Sebaliknya, 2 sapi kontrol yang diinfeksi dengan virus BIV-R29 tidak menimbulkan gejala klinis BIV sampai 42 hari pasca inokulasi sebagaimana diharapkan (McNab dkk., 2010).

Perubahan mikroskopik utama selama phase akut (demam) setelah infeksi JDV terjadi pada organ organ *lymphoid* yang ditandai dengan atenuasi folikel dan deplesi *germinal centres* sangat berat, serta reaksi hebat di daerah sekitar folikel kelenjar limfe dan daerah di luar folikel pada limpa. Tidak ada perubahan yang signifikan di beberapa jaringan seperti: kelenjar adrenal, uterus, ovarium, kelenjar mammae, vesika urinaria dan saluran cerna. Perubahan pada organ organ *lymphoid* tersebut adalah sama seperti dilaporkan sebelumnya (Dharma dkk., 1991) dan adalah merupakan ciri khas penyakit Jembrana.

Deplesi *germinal centres* (lokasi sel sel B) selama demam, di duga menyebabkan *immunosupresi* sementara setelah infeksi

JDV dan keterlambatan produksi antibodi terhadap JDV (Dharma dkk., 1991; Dharma dkk., 1994; Hartaningsih dkk., 1994; Wareing dkk., 1999), hal ini sama dengan yang dilaporkan pada infeksi lentivirus *simian immunodeficiency virus* (SIV) pada kera (Zhang dkk., 2007). Di duga bahwa reaksi proliferasi hebat yang terjadi di luar folikel pada organ *lymphoid* selama infeksi JDV dikaitkan dengan reaksi proliferasi sel sel T (Dharma dkk., 1991). Di dalam studi ini, reaksi hebat juga terjadi di daerah yang sama (di luar folikel), khususnya selama phase demam (akut), tetapi reaksi tersebut bukan karena infiltrasi sel sel T (CD3) melainkan infiltrasi sel sel *pleomorphic centroblast-like*, dan tidak dilaporkan sebelumnya (Chadwick dkk., 1998; Dharma dkk., 1991). Sel sel *centroblast-like* utamanya terdeteksi di luar folikel sekitar pulva merah dari limpa dan di daerah *medullary cords* dari kelenjar limfe. Di luar organ *lymphoid*, sel sel tersebut ditemukan di sekitar pembuluh darah, mengindikasikan bahwa sel sel tersebut beredar melalui darah dan berasal dari organ organ *limphoid*.

Setelah phase demam (5-6 hari setelah demam), derajat lesi lesi mikroskopis masih terlihat di dalam jaringan *limphoid* saja namun derajat keparahannya jauh menurun. Sel sel *centroblast-like* masih terlihat di sekitar folikel dan *medullary cords* tetapi jumlahnya sudah sangat sedikit dan digantikan oleh sel sel limposit kecil.

Jenis dan sub-populasi sel sel T (CD3) yang terlibat tidak dapat ditentukan. Antibodi poliklonal *rabbit anti-human CD3 marker* yang digunakan dalam penelitian ini diketahui paling tidak mengandung 4 komponen ( $\gamma, \sigma, \epsilon, \zeta$ ) dengan penyebaran berbeda. Pada sapi, lokasi distribusi utama sel sel  $\gamma, \sigma$  T-cells adalah permukaan epitel khususnya kulit dan usus dan hanya 1-3% ditemukan di dalam kelenjar limfe, suatu jumlah yang jauh lebih kecil dari sel sel T CD4<sup>+</sup> atau T CD8<sup>+</sup> (Mackay and Hein, 1989). Dinamika respon sel sel T selama phase akut penyakit Jembrana adalah hal yang menarik karena di saat belum adanya antibodi untuk melawan virus, adalah mungkin sel sel T khususnya sel T-CD8<sup>+</sup> bertindak sebagai sel mediasi respon immune sehingga kesembuhan terjadi.

Tidak ada perubahan yang signifikan terhadap kehadiran sel sel monosit/macrophage selama demam dan setelah demam. Sel sel tersebut hanya terlihat di sekitar *marginal zone* limpa dan dalam jumlah sangat sedikit.

Pelacakan capsid protein JDV digunakan untuk melacak infeksi JDV dan hasilnya sangat sama

dengan hasil penelitian pelacakan RNA JDV dengan teknik ISH untuk menunjukan penyebaran virus di dalam jaringan (Chadwick et al., 1998). Sel sel yang terinfeksi JDV bentuk morfologisnya sama dengan morfologi sel sel *pleomorphic centroblast-like* yang terdeteksi di luar folikel jaringan *lymphoid* selama phase akut. Sel sel yang positif dengan marker CD79 $\alpha\gamma$  (sel B) dan yang positif dengan marker IgG adalah sel sel yang sama. Fakta kuat dalam studi ini menunjukkan bahwa sel sel yang terinfeksi JDV atau sel sel yang menjadi target JDV adalah sel sel penghasil antibodi (sel sel plasma/ "*IgG containing cells*") tetapi studi lebih lanjut menggunakan *double staining techniques* sangat diperlukan untuk konfirmasi lebih pasti. Kedua virus sapi lainnya yakni bovine immunodeficiency virus (BIV) dan bovine lymphoma virus (BLV) juga di ketahui menyerang sel sel B (Ban dkk., 1993; Lavanya dkk., 2008; Whetstone dkk., 1997; Wu dkk, 2003) dan bila terbukti untuk JDV, hal ini akan menjelaskan hilangnya sel sel B dari dalam folikel dan terlambatnya produksi antibodi terhadap infeksi JDV pada sapi Bali.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ban, J., Portetelle, D., Altaner, C., Horion, B., Milan, D., Krchnak, V., Burny, A. and Kettmann, R. (1993). Isolation and characterization of a 2.3-kilobase-pair cDNA fragment encoding the binding domain of the bovine leukemia virus cell receptor. *J Virol* 67, 1050-1057.
- Barboni, P., Thompson, I., Brownlie, J., Hartaningsih, N. and Collins, M. E. (2001). Evidence for the presence of two bovine lentiviruses in the cattle population of Bali. *Vet Microbiol* 80, 313-327.
- Chadwick, B. J., Desport, M., Brownlie, J., Wilcox, G. E. and Dharma, D. M. (1998). Detection of Jembrana disease virus in spleen, lymph nodes, bone marrow and other tissues by in situ hybridization of paraffin-embedded sections. *J Gen Virol* 79 101-106.
- Dharma, D. M., Budiantono, A., Campbell, R. S. and Ladds, P. W. (1991). Studies on experimental Jembrana disease in Bali cattle. III. Pathology. *J Comp Pathol* 105, 397-414.
- Dharma, D. M., Ladds, P. W., Wilcox, G. E. and Campbell, R. S. (1994). Immunopathology of experimental Jembrana disease in Bali cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 44, 31-44.
- Hartaningsih, N., Wilcox, G. E., Kertayadnya, G. and Astawa, M. (1994). Antibody response to Jembrana disease virus in Bali cattle. *Vet Microbiol* 39, 15-23.
- Lavanya, M., Kinet, S., Montel-Hagen, A., Mongellaz, C., Battini, J. L., Sitbon, M. and Taylor, N. (2008). Cell surface expression of the bovine leukemia virus-binding receptor on B and T lymphocytes is induced by receptor engagement. *J Immunol* 181, 891-898.
- Mackay, C. R. and Hein, W. R. (1989). A large proportion of bovine T cells express the gamma delta T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. *Int Immunology* 1, 540-545.
- McNab, T., Desport, M., Tenaya, W. M., Hartaningsih, N. and Wilcox, G. E. (2010). Bovine immunodeficiency virus produces a transient viraemic phase soon after infection in *Bos javanicus*. *Veterinary Microbiology* 141, 216-223.
- Niku, M., Ekman, A., Pessa-Morikawa, T. and Iivanainen, A. (2006). Identification of major cell types in paraffin sections of bovine tissues. *BMC Vet Res* 2, 5.
- Soeharsono, S., Hartaningsih, N., Soetrisno, M., Kertayadnya, G. and Wilcox, G. E. (1990). Studies of experimental Jembrana disease in Bali cattle. I. Transmission and persistence of the infectious agent in ruminants and pigs, and resistance of recovered cattle to re-infection. *J Comp Pathol* 103, 49-59.
- Soeharsono, S., Wilcox, G. E., Putra, A. A., Hartaningsih, N., Sulistyana, K. and Tenaya, M. (1995a). The transmission of Jembrana disease, a lentivirus disease of *Bos javanicus* cattle. *Epidemiol Infect* 115, 367-374.
- Soeharsono, S., Wilcox, G. E., Dharma, D. M., Hartaningsih, N., Kertayadnya, G. and Budiantono, A. (1995b). Species differences in the reaction of cattle to Jembrana disease virus infection. *J Comp Pathol* 112, 391-402.
- Soeharsono, S., Budiantono, A., Sulistyana, K., Tenaya, M., Hartaningsih, N., Dharma, D. M. N., Soesanto, M. and Wilcox, G. E. (1996). Clinical changes in Bali cattle with Jembrana disease virus. In *Workshop on Jembrana Disease and the Bovine Lentiviruses* pp. 10-25. Edited by G. E. Wilcox, S. Soeharsono, D. M. N. Dharma and J. W. Copland: Australian Center for International Research.
- Soesanto, M., Soeharsono, S., Budiantono, A., Sulistyana, K., Tenaya, M. and Wilcox, G. E. (1990). Studies on

experimental Jembrana disease in Bali cattle. II. Clinical signs and haematological changes. J Comp Pathol 103, 61-71.

Wareing, S., Hartaningsih, N., Wilcox, G. E. and Penhale, W. J. (1999). Evidence for immunosuppression associated with Jembrana disease virus infection of cattle. Vet Microbiol 68, 179-185.

Whetstone, C. A., Suarez, D. L., Miller, J. M., Pesch, B. A. and Harp, J. A.

(1997). Bovine lentivirus induces early transient B-cell proliferation in experimentally inoculated cattle and appears to be pantropic. J Virol 71, 640-644.

Wu, D., Murakami, K., Morooka, A., Jin, H., Inoshima, Y. and Sentsui, H. (2003). In vivo transcription of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency-like virus. Virus Res 97, 81-87.