

Deteksi Virus Pada Level *Family* Menggunakan Protokol *Predict*

Muflihanah¹⁾, Fitrahadiyani¹⁾, Sitti Hartati Said¹⁾, Bagoes Poermadjaja¹⁾, Hendra Wibawa²⁾, Ernes Andhesfa³⁾, Nining Hartaningsih⁴⁾, Joko Pamungkas⁵⁾, Uus Saepuloh⁵⁾
Syafri Idris⁶⁾

¹⁾Balai Besar Veteriner Maros

²⁾Balai Besar Veteriner Wates

³⁾Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan

⁴⁾FAO Indonesia

⁵⁾Pusat Studi Satwa Primata

⁶⁾Direktorat Kesehatan Hewan

Intisari

Dalam upaya respon cepat dan identifikasi penyakit menular baru yang bisa menjadi ancaman bagi kesehatan manusia maka diperlukan suatu protokol. PREDICT merupakan bagian program *Emerging Pandemic Threats (EPT)* melakukan penelitian yang berfokus pada satwa liar yang paling mungkin membawa penyakit zoonosis.

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mendeteksi secara dini *emerging and re-emerging diseases* yang disebabkan oleh virus melalui beberapa target family dan genus pada unggas serta mamalia serta mempelajari kemungkinan adanya *interface* penularan penyakit dari satwa liar ke ternak.

Lima belas sampel unggas dan tiga puluh delapan sampel mamalia koleksi Balai Besar Veteriner Maros dideteksi terhadap family *Orthomyxovirus* (virus *Influenza A*), *Paramyxovirus*, *Coronavirus*, *Herpesvirus* dan *Picornavirus* (*Encephalomyocarditis virus*) dengan menggunakan teknik PCR dilanjutkan sekuensing berdasarkan protokol PREDICT.

Hasil menunjukkan swab itik Kab.Pinrang (MU9) positif terhadap family *orthomyxovirus* virus Influenza A. Deteksi *Paramyxovirus* menunjukkan semua sampel unggas negatif. Sampel mamalia negatif terhadap strain *Human Coronavirus* dan *Bat Coronavirus*. Swab hidung babi dari Jayapura Papua (MM5) dan Kab. Maros (MM13), darah kambing dari Takalar (MM 27) positif terhadap *Herpesvirus*. Deteksi *Picornavirus* spesifik *Encephalomyocarditis virus* ditemukan positif pada swab babi dari Kab.Maros (MM14) dan Kota Manado Sulawesi Utara (MM 18) serta swab sapi Bali dari Bombana Sulawesi Tenggara (MM 22).

Hasil sekuensing menunjukkan darah kambing dari Kab.Takalar Sulawesi Selatan memiliki kesamaan genetik 98-99% dengan virus *Caprine herpesvirus* tipe 2. Swab nasal babi dari Maros Sulawesi Selatan, Manado Sulawesi Utara serta swab nasal sapi dari Bombana Sulawesi Tenggara didapatkan kesamaan genetik 97% dengan *Encephalomyocarditis virus* isolat Sing-M105-02. Swab itik dari Pinrang Sulawesi Selatan didapatkan kesamaan genetik 94-98% Influenza A Virus isolatA/duck/Victoria/0305-2/2012 (H5N3).

Terdeteksinya *partial gene* penyakit *emerging* dan *re-emerging* virus pada sampel ternak yaitu virus *Caprine Herpesvirus 2* pada kambing akan mengakibatkan implikasi klinis penyakit *Malignant Catarrhal Fever* (MCF). Virus *Encephalomyocarditis* yang ditemukan pada babi dan sapi mengakibatkan implikasi peradangan jantung dan gangguan reproduksi pada babi.

Kata Kunci : Family Virus, Protokol Predict

Pendahuluan

Penyakit zoonosis berdampak pada manusia dan ekonomi secara global. Terdapat kurang lebih 75% penyakit yang baru muncul (*emerging diseases*) merupakan zoonosis. Dalam era globalisasi dan perdagangan, perjalanan penyakit ini sangat cepat berpengaruh pada kesehatan masyarakat dan ekonomi. Mayoritas *Emerging Infectious Diseases* (EIDs) pada manusia merupakan zoonosis, berasal dari satwa liar dan sebagian besar disebabkan oleh virus diantaranya *Avian Influenza*, *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS), Nipah Virus, Ebola, MERS-CoV yang menjadi ancaman dunia (Anthony *et al.*, 2013). Zoonosis muncul di satwa liar dan mampu mengeinfeksi hewan domestik dan manusia. Munculnya *acquired immune deficiency syndrome* (AIDS) yang disebabkan oleh virus (HIV) karena adanya kontak manusia dan satwa primata. Wabah Ebola manusia pertama kali di dunia karena adanya kontak dengan kera besar tertular yang diburu untuk dimanfaatkan dagingnya. Munculnya wabah SARS di Cina disebabkan oleh virus corona dihubungkan dengan perdagangan internasional carnivora kecil. Burung-burung liar merupakan reservoir virus *West Nile* dimana virus ini menjadi penyebab wabah pada burung yang terus berlanjut dan berpindah ke manusia dan kuda (Naipospos, 2010). Epidemik virus Nipah yang awalnya ditemukan pada kelelawar kemudian menular ke babi dan selanjutnya ke manusia yang menyebabkan kematian lebih dari 100 orang di Malaysia dan Singapura (Lim *et al.*, 2002).

Dalam upaya untuk mengidentifikasi dan respon terhadap penyakit zoonosis baru sebelum menyebar ke manusia, *U.S. Agency for International Development (USAID)* membentuk *Emerging Pandemic Threats (EPT)*. Program EPT terdiri dari empat proyek: PREDICT, RESPOND, IDENTIFY dan PREVENT. PREDICT berusaha untuk mengidentifikasi penyakit menular baru yang bisa menjadi ancaman bagi kesehatan manusia. PREDICT melakukan penelitian yang berfokus pada satwa liar yang paling mungkin untuk membawa penyakit zoonosis seperti kelelawar, tikus, dan primata non-manusia. PREDICT telah mengembangkan dan mengoptimalkan protokol untuk mendeteksi dan menemukan virus pada target family pada hewan yang dapat menyebabkan penyakit dan epidemik pada manusia termasuk *alphavirus*, *arenavirus*, *astrovirus*, *bunyavirus*, *coronavirus*, *filovirus*, *flavivirus*, *herpesvirus*, *orthomyxovirus*, *paramyxovirus*, *poxvirus*, *reovirus*, *retrovirus* dan *rhabdovirus* (USAID PREDICT, 2009). Pendekatan diagnostik yang dilakukan adalah kombinasi antara teknik PCR dengan sekuensing. Teknik PCR merupakan metode yang utama digunakan.

Pengujian sampel pada satwa liar telah dilakukan di negara berisiko tinggi seperti Bangladesh, Brazil, China, Kolombia, Indonesia, Malaysia, dan Meksiko. Setelah para ilmuwan mengumpulkan sampel, mereka menganalisis sampel di laboratorium untuk identifikasi penyakit. Penyakit yang ditemukan dimasukkan dalam data dasar untuk pembuatan peta prediksi wabah penyakit. Pendekatan ini tidak hanya memungkinkan para peneliti untuk menemukan penyakit baru, tetapi juga membantu masyarakat mempersiapkan dan menanggapi ancaman wabah.

PREDICT telah mengidentifikasi virus baru sebanyak 812 jenis dan 147 yang telah diketahui pada satwa liar termasuk di Indonesia (USAID PREDICT, 2009). Berdasarkan hal tersebut FAO bekerjasama dengan PREDICT dan Kementerian Pertanian melakukan identifikasi virus pada beberapa level family virus dan genus dari sampel unggas dan mamalia untuk mendeteksi kemungkinan munculnya *emerging diseases*.

Tujuan

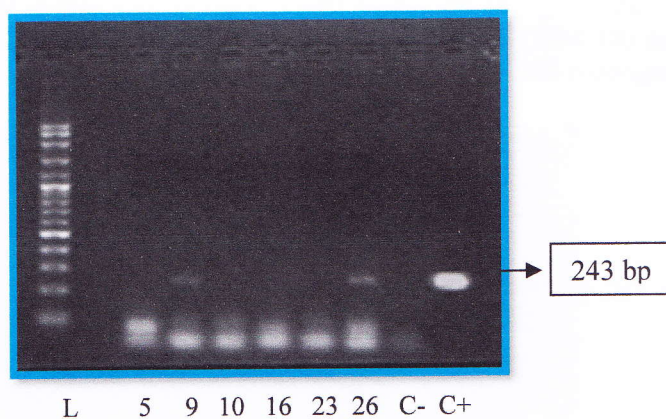
Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mendeteksi secara dini *emerging and re-emerging diseases* melalui target family virus dan genus pada unggas dan mamalia serta mempelajari kemungkinan *interface* penularan penyakit dari satwa liar ke ternak.

Materi dan Metode

Lima belas (15) sampel unggas dilakukan deteksi terhadap family *Orthomyxovirus* virus *Influenza A* dan *Paramyxovirus* serta tiga puluh delapan (38) sampel mamalia berasal dari koleksi Balai Besar Veteriner Maros dilakukan deteksi terhadap family *Orthomyxovirus* virus *Influenza A*, *Coronavirus*, *Herpesvirus* pada target gen *polymerase* dan *terminase* serta *Picornavirus* genus *Encephalomyocarditis* virus. Pemilihan sampel dilakukan dengan melihat jenis sampel dan asal daerah. Deteksi family virus dilakukan dengan menggunakan teknik PCR berdasarkan protokol yang telah dikembangkan oleh PREDICT. Dalam pengujian sampel menggunakan kontrol positif universal. Hasil positif PCR dilanjutkan dengan sekuensing.

Hasil

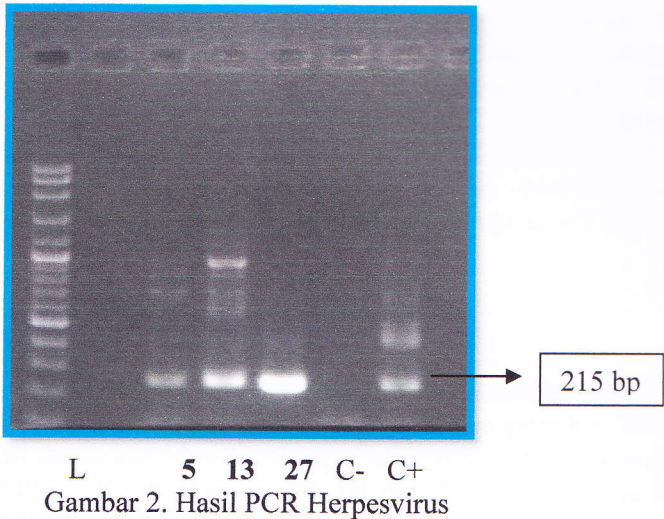
Hasil menunjukkan deteksi family *Orthomyxovirus* virus *Influenza A* menggunakan primer dengan target gen *Matriks* menunjukkan bahwa sampel itik Kab. Pinrang (MU9) positif terhadap virus *Influenza A* pada target gen 243 bp.



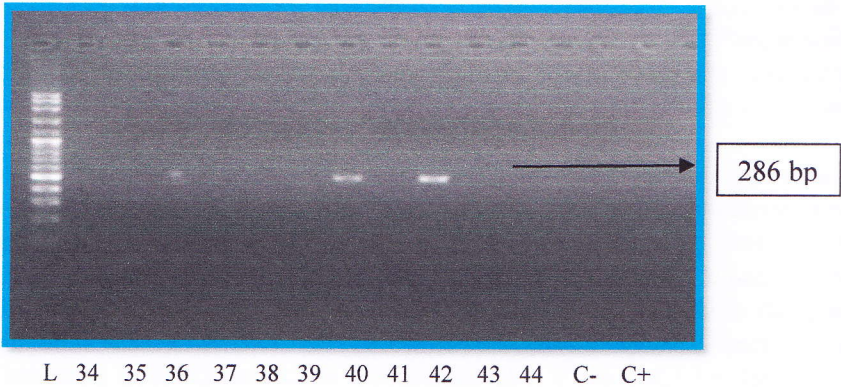
Gambar 1. Hasil PCR Virus Influenza A

Deteksi *Paramyxovirus* menggunakan teknik *hemi-Nested PCR* dengan target gen *polymerase* pada *round 1* pada 639 bp dan *round 2* pada 561 bp menunjukkan semua sampel unggas menunjukkan negatif terhadap *Paramyxovirus*. Deteksi terhadap *Coronavirus* dilakukan terhadap sampel mamalia dengan target gen *RNA Dependent RNA polymerase (RdRp)* untuk mendeteksi strain *Human Coronavirus* menggunakan teknik *Nested PCRs* menunjukkan bahwa semua sampel negatif terhadap terhadap *Human Coronavirus* dan *Bat Coronavirus*.

Deteksi terhadap *Herpesvirus* dilakukan terhadap sampel mamalia dengan target gen *polymerase* dan *terminase*. Hasil pengujian menunjukkan bahwa sampel swab hidung babi dari Jayapura Papua (MM5), sampel swab babi dari Kab. Maros (MM13), sampel darah Kambing dari Takalar (MM 27) positif terhadap *Herpesvirus*.



Deteksi picornavirus pada sampel mamalia dengan menggunakan primer spesifik untuk mendeteksi EMCV ditemukan sampel positif yaitu sampel swab dari babi di Kab.Maros (MM14), swab babi dari Kota Manado Sulawesi Utara (MM 18) dan swab sapi Bali dari Bombana Sulawesi Tenggara (MM 22) pada target gen 286 pasangan basa.



Hasil positif PCR pada target family virus kemudian dilanjutkan dengan sekuensing untuk melihat virus secara spesifik.

Tabel 1. Hasil Sekuensing

No	Kode	Jenis Sampel	Jenis Hewan	Kab/Kota	Th Koleksi	HASIL IDENTIFIKASI VIRUS (Kesamaan Genetik)
1	MM27	Darah	Kambing	Takalar, Sulsel	2015	Caprine herpesvirus 2 (Pol and Term genes, 98-99%)
2	MM28	Darah	Kambing	Takalar, Sulsel	2015	Caprine herpesvirus 2 (Term genes, 99%)
3	MM14	Nasal Swab	Babi	Maros, Sulsel	2015	Encephalomyocarditis virus(Isolate Sing-M105-02, 97%)
4	MM18	Nasal Swab	Babi	Manado, Sulut	2015	Encephalomyocarditis virus(Isolate Sing-M105-02, 97%)
5	MM22	Nasal Swab	Sapi Bali	Bombana, Sultra	2015	Encephalomyocarditis virus(Isolate Sing-M105-02, 97%)
6	MU9	Oral Swab	Itik	Pinrang, Sulsel	2014	Influenza A Virus (Matrix Gene, 94-98%)

Hasil menunjukkan sampel darah Kambing dari Takalar, Sulawesi Selatan memiliki kesamaan genetik 98-99% dengan virus *Caprine herpesvirus* tipe 2 pada target gen *polymerase* dan *terminase*. Swab nasal babi dari Maros Sulawesi Selatan, Manado Sulawesi Utara dan swab nasal sapi dari Bombana Sulawesi Tenggara didapatkan kesamaan genetik 97% dengan *Encephalomyocarditis virus* isolat Sing-M105-02. Swab oral itik dari Pinrang Sulawesi Selatan didapatkan kesamaan genetik 94-98% Influenza A Virus isolatA/duck/Victoria/0305-2/2012(H5N3) pada gen matrix protein 2 (M2).

PEMBAHASAN

Deteksi terhadap family orthomyxovirus virus *Influenza A* dilakukan pada semua sampel baik sampel unggas maupun sampel mamalia berdasarkan protokol PREDICT menggunakan primer dengan target gen Matriks. Sampel unggas ditemukan positif yaitu sampel itik Kab. Pinrang (MU9). Swab oroparingeal itik dari Pinrang Sulawesi Selatan didapatkan kesamaan genetik 94-98% Influenza A Virus isolatA/duck/Victoria/0305-2/2012(H5N3) pada gen matrix protein 2 (M2). Penyakit *Avian Influenza* masih terus mewabah di beberapa daerah di Indonesia.

Deteksi terhadap family *Paramyxovirus* menunjukkan bahwa seluruh sampel unggas negatif. *Paramyxovirus* sangat patogen pada hewan seperti ayam, kalkun, hewan akuatik seperti salmon, ikan hiu, ikan paus, lumba-lumba, rodentia, kuda, sapi, kelelawar, babi dan manusia. Family *Paramyxovirus* pada hewan diantaranya virus Nipah dan Hendra yang mengakibatkan infeksi serius dan fatal pada manusia. *Paramyxovirus* merupakan target yang penting dikembangkan untuk mendeteksi virus baru. Primer yang digunakan berasal dari daerah sejati (*high conserved region*) pada genom (Tong *et al.*, 2008).

Coronavirus dibagi menjadi empat genera berdasarkan *antigenic cross-reactivity* dan sekuen nukleotida yaitu *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* dan *Deltacoronavirus*. *Alphacoronavirus* dan *Betacoronavirus* berkaitan dengan infeksi pada mamalia termasuk manusia sedangkan *Gammacoronavirus* dan *Deltacoronavirus* sangat berkaitan dengan infeksi pada unggas. Hal yang menarik adalah dampaknya terhadap ternak babi dan peternakan unggas. Kelelawar merupakan reservoir yang penting pada beberapa penyakit zoonosis disebabkan oleh virus yang berdampak pada kesehatan hewan dan kesehatan manusia. Virus dari kelelawar menular ke manusia dengan kontak langsung melalui gigitan atau saliva hewan yang terinfeksi dan udara (Quan *et al.*, 2010). Ada dua *emerging diseases* dari genera *Betacoronavirus* yaitu SARS-CoV dan MERS-CoV. Hasil pengujian menunjukkan semua sampel mamalia negatif terhadap Coronavirus baik *Human Coronavirus* maupun *Bat Coronavirus*.

Pada pengujian ini ditemukan sampel positif terhadap *Herpesvirus* dari sampel swab nasal babi dan darah kambing. Deteksi terhadap *Herpesvirus* dilakukan terhadap sampel mamalia dengan target gen *polymerase* dan *terminase*. Hasil sekuensing menunjukkan sampel darah kambing dari Takalar, Sulawesi Selatan memiliki kesamaan genetik 98-99% dengan *Caprine herpesvirus* tipe 2. Virus ini dapat mengakibatkan penyakit *Malignant catarrhal fever* (MCF) pada mamalia (Le *et al.*, 2003). Ditemukannya positif PCR dan hasil sekuensing *Caprine herpesvirus* tipe 2 pada Kambing menunjukkan bahwa perlu perhatian serius terhadap penyakit hewan di luar penyakit hewan menular strategis.

Deteksi family *Picornaviridae* genus *Cardiovirus* virus *Encephalomyocarditis* ditemukan sampel positif yaitu sampel swab dari babi dan swab sapi. Dari hasil sekuensing swab nasal babi dari Maros Sulawesi Selatan, Manado Sulawesi Utara dan swab nasal sapi dari Bombana Sulawesi Tenggara didapatkan kesamaan genetik 97% dengan *Encephalomyocarditis virus* isolat Sing-M105-02. *Encephalomyocarditis* (EMCV-1 dan EMCV-2) menginfeksi beragam mamalia. Pada babi dikenal dua strain

yaitu EMCV 1 dan EMCV-2. Dari EMCV-1 yaitu strain A menyebabkan kelainan reproduksi dan strain B menyebabkan kelainan pada jantung. Rodensia merupakan inang alami dan reservoir dari virus ini. Penularan pada mamalia yang lain (manusia, satwa primata, gajah, babi, kuda dan sapi) diduga akibat *virus spillover* dari populasi rodensia liar (*wild mice and rats*). Pada individu terinfeksi virus akan *shedding* pada urin, tinja dan sekresi pada saluran pernafasan. Implikasi Infeksi EMCV yaitu sangat ganas pada babi dan kera (usia muda) dengan gejala khas peradangan otot jantung. Pada babi selain myocarditis, EMCV menyebabkan gangguan reproduksi seperti abortus, kemajiran, mumifikasi dan *stillbirth*. Termasuk *zoonotic agent* tetapi pada manusia umumnya *asymptomatic*. (Carocci *et al.*, 2012).

Munculnya hasil positif EMCV maka diperlukan perhatian terhadap penyakit babi yang lain selain CSF dan PRRS. Selain itu telah terjadi *interface* dari satwa liar (rodensia liar) ke hewan domestik sapi dan babi.

KESIMPULAN DAN SARAN

Deteksi virus pada tingkat family menggunakan protokol PREDICT kombinasi PCR dan sekuensing memiliki sensitifitas tinggi dan dapat digunakan untuk mendeteksi virus baru dari unggas dan mamalia. Terdeteksinya *partial gene* beberapa *emerging* dan *re-emerging* virus pada sampel ternak, antara lain virus *Caprine Herpesvirus 2* pada kambing akan mengakibatkan implikasi klinis penyakit *Malignant Catarrhal Fever* (MCF), sedangkan virus *Encephalomyocarditis* yang ditemukan pada babi dan sapi akan mengakibatkan implikasi peradangan jantung dan gangguan reproduksi pada babi. Ditemukannya EMCV pada babi dan sapi menunjukkan bahwa telah terjadi *interface* dari satwa liar (rodensia liar) ke hewan domestik.

Protokol PREDICT dapat diterapkan untuk *screening* penyakit *emerging* dan *re-emerging* virus serta bagian dari diagnosa komprehensif di Balai Besar Veteriner dan Balai Veteriner di Indonesia. Selain itu dapat digunakan sebagai alternatif protokol diagnostik untuk *risk-assessment* di wilayah/zona bebas penyakit.

Perlu dilakukan kajian lebih lanjut untuk mengetahui *interface* penularan penyakit dari satwa liar ke hewan domestik.

KETERBATASAN/LIMITASI

Adapun keterbatasan dari penelitian ini adalah sampel hanya diambil dari koleksi Balai Besar Veteriner Maros di beberapa wilayah tetapi tidak diketahui apakah daerah pengambilan sampel memiliki risiko *interface* penularan penyakit dari satwa liar ke ternak.

DAFTAR PUSTAKA

- Anthony, S.J., Epstein, J.H., Murray, K.A., Navarette-Maclas, I., Torrelío, C.M.Z., Solovyov, A., Flores, R.O., Arrigo, N.C., Islam, A., Khan, A.A., Hosseini, P., Bogich, T.L., Olival, K.J., Leon, M.D.S., Karesh, W.B., Goldstein, Tracey., Luby, S.P., Morse, S.S., Mazet, J.A.K., Daszak, P., Lipkin, W.I. 2013. A strategy to Estimate Unknown Viral Diversity in Mammals. *mBio* 4(5) : e00598.13
- Carocci, M., Bakkali-Kassimi, L.. 2012. The encephalomyocarditis virus. *Virulence* 3:4, 351–367; July 1, 2012; G 2012 Landes Bioscience

- Lam, S. K., Chua K. B.. 2015. Nipah Virus Encephalitis Outbreak in Malaysia. *Clinical Infectious Diseases* 2002:34 (Suppl 2)
- Li, H., Wunschmann, A., Keller, J., D., Hall, G., Crawford, T. B. . 2003. Caprine herpesvirus-2-associated malignant catarrhal fever in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Vet Diagn Invest* 15:46–49 (2003)
- Naipospos, T. 2010. Perdagangan satwa liar dan risiko penyakit zoonosis. Blog Veterinerku
- Quan, P.L., Firth, C., Street, C., Henriquez, J. A., Petrosov, A., Tashmukhamedova A., Hutchison, S.K., Egholm, M., Osinubi, M.O.V., Ogunkoya, A.B., Briese, T., Rupprecht, C.E., Lipkin, W.I..2010. Identification of a Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-like Virus in a Leaf-Nosed Bat in Nigeria. *mBio* 1(4) e00208-10
- Tong, S., Chern, S.W.W, Li, M., Pallansch, M.A., Anderson, L.J.. 2008. Sensitive and Broadly Reactive Reverse Transcription-PCR Assays To Detect Novel Paramyxoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, Aug 2008 p. 2652-2658.
- USAID PREDICT. Virus Detection and Discovery, Reducing Pandemic Risk, Promotion Global Health. <http://predict.global>