

Deteksi Virus *Classical Swine Fever* di Bali dengan RT-PCR

(DETECTION OF CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS IN BALI WITH RT-PCR)

I Wayan Wirata¹, Ida Ayu Sri Chandra Dewi¹, I Gusti Ngurah Narendra Putra¹,
Ida Bagus Oka Winaya², Ida Bagus Kade Suardana³, Tri Komala Sari³,
I Nyoman Suartha⁴, I Gusti Ngurah Kade Mahardika^{1*}

¹Laboratorium Biomedik Veteriner

Jl Seseetan Gang Markisa No. 6 Denpasar-Bali, telp. 0361-8423062;

²Laboratorium Patologi Veteriner; ³Laboratorium Virologi Veteriner;

⁴Laboratorium Penyakit Dalam Hewan Besar, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas
Udayana, Jl. P.B Sudirman, Denpasar, Tlp. (0361) 223791

Email: drh.wirata@gmail.com

*Korespondensi: gnmahardika@indosat.net.id

ABSTRACT

Classical Swine Fever (CSF) virus has been confirmed for the first time in pig in Bali. The object of this study was suspected CSF cases diagnosed at the diagnostic laboratory assistantship of the Faculty of Veterinary Medicine, Udayana University, in 2007-2008. Total number of cases was 12. Case records included the signalment of case (breed, age, body weight, and the origin of respective case), clinical signs, post-mortem lesions, and histological pictures. CSF virus was confirmed using the standardized *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) for CSF from European Union. One RT-PCR product was sequenced. CSF virus was confirmed in seven out of 12 cases (58%). The cDNA sequence was confirmed to be specific of CSF E2 protein coding region with 98% homology to one isolate from China that was available in GeneBank. Further works are recommended to elucidate the sensitivity of RT-PCR, to clarify some differential diagnose, and to find out the genetic variation of CSF virus in Bali.

Key words: classical swine fever virus, Bali, RT-PCR

Key words: classical swine fever virus, Bali, RT-PCR

PENDAHULUAN

Classical Swine Fever (CSF) atau yang dikenal dengan nama *Hog cholera* merupakan salah satu penyakit menular yang secara ekonomi paling penting pada babi di dunia (Fenner *et al.*, 2003). Penyakit ini menyebabkan kerugian ekonomi yang besar karena biaya eradikasi serta vaksinasi yang sangat mahal. Penyakit itu disebabkan oleh virus dari keluarga *Flaviviridae*, genus *Pestivirus* (Fenner *et al.*, 2003). Dalam genus itu, virus CSF bergabung bersama virus diare sapi (*bovine viral diarrheal BVD*). Kedua virus itu juga mempunyai hubungan antigenik (OIE, 2008).

Laporan ilmiah tentang isolasi dan identifikasi CSF tidak tersedia di Indonesia. Akan tetapi, vaksin untuk pencegahannya telah dipasarkan sejak puluhan tahun terakhir ini.

Hal yang sama terjadi di Bali. Selama ini, diagnosis penyakit CSF umumnya dilakukan dengan melihat gejala klinik dan lesi-lesi bedah bangkai pada hewan penderita. Berdasarkan pendekatan itu, penyakit CSF sering dikelirukan dengan penyakit lain. Diagnosis banding antara lain *African swine fever*, *porcine dermatitis and nephropathy syndrome* (PDNS), *post-weaning multisystemic wasting syndrome* (PMWS), *thrombocytopenic purpura*, salmonellosis, erysipelas, pasteurellosis, actinobacillosis, dan infeksi *Haemophilus parasuis* (OIE, 2008). Berbagai agen bakteri yang tersebut tadi memang sering menyebabkan infeksi ikutan sehingga menutupi kasus CSF (Gregg, 2002).

Oleh karena itu peneguhan diagnosis penyakit menjadi amat penting. Peneguhan penyakit dengan teknik *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) dilaporkan

memberikan hasil akurat (Suartha *et al.*, 2008). Teknik RT-PCR berdasarkan protokol EU (2002) telah dicobakan sejak tahun 2007 di Laboratorium Biomedik Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar. Laporan kasus-kasus tersangka CSF dan penerapan deteksi genom serta hasil sekuensing cDNA CSF dilaporkan dalam artikel ini.

METODE PENELITIAN

Kasus

Sebanyak 12 kasus tersangka CSF dibahas dalam artikel ini. Sampel dikumpulkan dari tahun 2007-2008. Deskripsi kasus-kasus tersebut ditampilkan pada Tabel 1. Babi kasus tersangka CSF dinekropsi di laboratorium Patologi Veteriner FKH Unud. Organ yang mengalami perubahan secara patologi anatomis, seperti limpa, ginjal dan usus besar ditampung dalam media transport (Media 199, penicillin 1000 IU/ml, Streptomisin 1000 uG/ml) dan disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan.

Isolasi RNA dan RT-PCR

Spesimen berupa organ limpa, hati, ginjal dan usus dipotong kecil-kecil dan dihancurkan dalam eppendorf, kemudian ditambahkan PBS (hingga mendapatkan larutan 10%). Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 *ref* selama 10 menit. Supernatan diambil sebanyak 250 μ l dan dimasukkan ke dalam eppendorf baru. Isolasi RNA dilakukan dengan Trizol (Invitrogen) seperti protokol yang telah dipublikasikan (Suartha *et al.*, 2008; Kencana *et al.*, 2008). Protokol RT-PCR CSF juga dilakukan sesuai protokol untuk virus distemper anjing dan gen polymerase avian influenza (Suartha *et al.*, 2008; Kencana *et al.*, 2008), dengan beberapa modifikasi. Primer yang digunakan adalah primer baku EU (2002) yang mengamplifikasi gen target E2 (Paton *et al.*, 2000). Sekuens dari primer adalah VCSFF 5'-AGRCCAGACTGGTGGCCNTAYGA-3' dan VCSFR 5'-TTYACCACTTCTGTTCTCA-3'. Produk RT-PCR hasil isolasi disekuens di Eijkman Institut, Jakarta. Sebagai kontrol positif digunakan RNA yang diisolasi dari vaksin CSF aktif. Sedangkan kontrol negatif adalah RNA yang diisolasi dari limpa babi yang sehat dan tidak divaksin. Produk RT-PCR dipurifikasi dengan QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) dan disekuens dengan menggunakan Big Dye

Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, dengan kedua primer tersebut diatas. Sekuensing dijalankan pada Automatic DNA sequencer Applied Biosystem 3130 /3130x Genetic Analyzer. Identifikasi hasil sekuensing dibaca dengan Sequence Scanner Ver1.0 (Applied Biosystems <http://www.appliedbiosystems.com>). Penyepadanan nukleotida dan asam amino dilakukan dengan menggunakan Mega4 Software (Tamura *et al.*, 2007).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Artikel ini merupakan laporan ilmiah pertama tentang CSF di Indonesia, khususnya Bali. CSF merupakan salah satu penyakit virus yang paling penting bagi industri peternakan babi. Babi merupakan satu-satunya spesies yang rentan terhadap CSF, dan babi yang terinfeksi merupakan sumber penularan kepada babi yang lain. CSF pada hewan lain belum pernah dilaporkan. Virus CSF berhubungan secara genetik dan antigenik dengan virus bovine viral diarrhea (BVD) (OIE, 2008), akan tetapi infeksi CSF pada sapi juga belum pernah dilaporkan (Gregg, 2002). Penularan alami terjadi melalui kontak langsung antara babi yang terinfeksi dengan babi sehat (Fenner *et al.*, 2003). Penularan penyakit dapat terjadi sebelum munculnya gejala klinis. Virus disebarkan lewat cairan mulut, hidung, mata, kemih, semen, tinja dan darah (Gregg, 2002). Babi yang sembuh dari CSF atau yang menderita penyakit kronis dapat menyebarkan virus selama berbulan-bulan.

Dari 12 kasus tersangka CSF, signalemen, gejala klinis, perubahan patologi anatomi, dan histopatologi yang menonjol ditampilkan pada Tabel 1. Kasus yang dianalisis berasal dari Kabupaten Gianyar, Bangli, Tabanan dan Kota Denpasar. Semua babi kasus berumur dibawah 3,5 bulan. Data umur yang dipaparkan tidak merupakan referensi umur babi yang peka CSF. Hal ini semata-mata karena hewan yang dapat dipelajari dan dinekropsi di Laboratorium Patologi hanya babi kecil. Tiga diantaranya sudah pernah divaksinasi CSF. Gejala klinis yang tercatat adalah anoreksia, demam (40 – 41,3°C), konjungtivitis, eritema pada telinga, mulut, abdomen, dan ekor, dispnea, diare, dan gejala syaraf (inkoordinasi/tremor/gerakan mengayuh sepeda).

Gejala klinis yang diamati dalam kajian ini sejalan dengan gejala-gejala CSF yang baku.

Gejala CSF akut yang umumnya dilaporkan antara lain konjungtivitis, demam tinggi, anoreksia, diare yang encer berlendir dan berwarna abu-abu kekuningan, batuk dan sesak nafas. Pada akhir perjalanan penyakit babi menunjukkan gejala eritema (di telinga, moncong, abdomen, dan paha sebelah dalam), ataksia dan paresis, kejang-kejang, dan kematian dalam waktu 5-15 hari setelah gejala klinik mulai tampak (Gregg, 2002; Artois *et al.*, 2002; Fenner *et al.*, 2003; OIE, 2008). Kematian dapat mendekati 100% pada babi muda (Fenner *et al.*, 2003). Gejala-gejala tersebut tidak selalu seragam tercatat pada kasus-kasus yang dipelajari. Gejala yang konsisten adalah anoreksia, demam (40 – 41,3°C), konjungtivitis, eritema (telinga, mulut, abdomen, atau ekor), dispnea dan diare. Sedangkan gejala saraf, seperti inkoordinasi/tremor/gerakan mengayuh sepeda tidak selalu tercatat serta bervariasi antar kasus.

Pada pemeriksaan bedah bangkai/patologi anatomi ditemukan perubahan-perubahan ulkus kancing (*button ulcer*) pada lima kasus, perdarahan atau anemia paru-paru (5 kasus), adanya timbunan gas di usus (2 kasus), perdarahan ginjal (5 kasus), perdarahan limpa (3 kasus), dan kongesti selaput otak (3 kasus). Kasus CSF umumnya menunjukkan lesi-lesi pembengkakan, edema, dan perdarahan kelenjar limfe, infark pada ginjal, perdarahan ekimotik dan/atau titik pada jaringan serosa dan mukosa, kulit, epiglotis, dan ginjal (Gregg, 2002; Fenner *et al.*, 2003). Menurut Gregg (2002) pada kasus kronik, perubahan dapat serupa dengan kasus akut, akan tetapi biasanya lebih ringan. Lesi-lesi berbentuk kancing (*button ulcer*) sering ditemukan pada sekum dan usus besar. Lesi-lesi patologi anatomi merupakan hal yang paling beragam pada CSF tergantung pada virulensi virus dan galur, umur, serta kondisi babi (Gregg, 2002). CSF virulen pada babi yang peka bersifat pantropik, yaitu menginfeksi berbagai jaringan, terutama endotel, epitel, limfoid, dan endokrin (Gregg, 2002). Contoh lesi ulkus kancing (*button ulcer*) ditampilkan pada Gambar 1. Sedangkan contoh perubahan khas histopatologi ditampilkan pada Gambar 2.

Secara histopatologi, lesi yang sering ditemukan adalah pneumonia interstitialis, enteritis hemoragika dan nekrotikan, glomerulonefritis, dan perdarahan dan nekrosis pada limpa. Lesi tambahan pada beberapa kasus adalah bronkitis, kongesti dengan gambaran vaskulitis otak, meningitis, ensefalitis,

perikarditis, dan endokarditis. *Perivascular cuffing* ditemukan pada 75% kasus CSF akut. Pada sebagian besar kasus juga ditemukan deplesi jaringan limfoid. Lesi histopatologi tidak mencari/patognomonik. Lesi meliputi degenerasi parenkim dari jaringan limpatik, proliferasi selular dari jaringan interstitial vaskular dan nonsuppurative meningoencephalomyelitis dengan atau tanpa vascular cuffing (OIE, 2008).

Secara umum, gejala-gejala, perubahan patologi, dan lesi histopatologi yang ditemukan pada kasus-kasus tersangka CSF pada kajian ini tidak konsisten. Inkonsistensi tersebut merupakan fenomena khas CSF. Gejala dan lesi-lesi yang beragam menyebabkan CSF tidak dapat didiagnosis tanpa konfirmasi laboratorium (OIE, 2008). Deteksi CSF umumnya dilakukan dengan teknik biakan sel, imunohistokimia, dan *fluorescent antibody technique* (FAT) (Mulas *et al.*, 1997; Handel *et al.*, 2004; OIE, 2008). Teknik molekuler baru yakni *reverse-transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) telah banyak direkomendasikan sebagai penunjang diagnosis (de Smit, 2000; Handel *et al.*, 2004; OIE, 2008), baik dengan metode konvensional mau pun *real time* RT-PCR (McGoldrick *et al.*, 1998; Kaden *et al.*, 2007). Berdasarkan kecepatan dan sensitifitas, RT-PCR telah diterima sebagai pendekatan yang tepat untuk penapisan kasus tersangka di berbagai negara termasuk negara-negara di Uni Eropa (EU, 2002). Primer dan kondisi RT-PCR untuk CSF juga sudah dibakukan (<http://viro08.tiho-hannover.de/eg/TechnicalPart4.pdf>). Teknik itu juga memungkinkan pemetaan epidemiologi molekuler CSF dan memperoleh hubungan genetik berbagai isolat. Produk RT-PCR dapat disekuens untuk memperoleh data sekuens sehingga dapat dibandingkan dengan sekuens isolat lain serta isolat yang tersedia di *GeneBank* (Hongzhuan *et al.*, 2005). Sensitivitas dan spesifisitas satu ronde RT-PCR mencapai masing-masing 82,5% dan 100% (Harding *et al.*, 1996). Jika produk RT-PCR diamplifikasi kembali, sensitivitasnya dapat ditingkatkan sampai 100% (Harding *et al.*, 1996). RT-PCR bahkan dapat dilakukan dengan sampel kulit babi tersangka (Kaden *et al.*, 2007).

Hasil RT-PCR menunjukkan bahwa CSF dapat dikonfirmasi pada 7 dari 12 kasus (58%). Rangkuman hasil RT-PCR pada masing-masing kasus dapat dilihat pada Tabel 2. Contoh gambar elektroforesis hasil RT-PCR ditunjukkan pada Gambar 3. Gambar tersebut menunjukkan bahwa protokol amplifikasi RT-PCR terhadap

Tabel 1. Diskripsi, signalemen, gejala klinis, perubahan patologi anatomi, dan histopatologi kasus tersangka CSF di Bali tahun 2007-2008

No	Kode Kasus	Signalemen	Gejala Klinis	Perubahan PA	Lesi Histopatologi
1.	59/N/07	Landrace, 65 hari, 8 kg, belum divaksinasi CSF, Payangan-Gianyar.	Anoreksia, mata bengkak, eritema pada daerah telinga, mulut dan abdomen, demam (40,6°C), lemas, diare dan bergerombol di pojok kandang.	- Paru-paru pucat - <i>Button ulcer</i> pada usus	- Pneumonia interstitialis - bronkhitis - Entritis hemoragika dan nekrotikan - Glomerulonefritis - Perdarahan dan nekrosis pada limpa - Kongesti dan vaskulitis otak
2.	64/N/07	Landrace, 2 bulan, 8 kg, belum divaksinasi CSF, Marga-Tabanan	Anoreksia, Konjungtivitis, eritema pada telinga, moncong dan ekor, lemas, demam (40,9°C) dan diare.	- Terdapat timbunan gas pada usus dan <i>button ulcer</i> pada usus besar (colon)	- Pneumonia interstitialis - Entritis hemoragika dan nekrotikan - Perdarahan dan nekrosis pada limpa - Glomerulonefritis
3.	69/N/07	Landrace, 45 hari, 5 kg, sudah divaksinasi CSF, Payangan-Gianyar	Anoreksia, eritema pada ujung telinga dan moncong hidung, demam (41,3°C), lemah, inkoordinasi, diare abu-abu, bergerombol di pojok kandang.	- Hati warnanya lebih gelap- Perdarahan pada usus besar dan adanya <i>button ulcer</i> - Perdarahan titik pada ginjal	- Pneumonia interstitialis - Bronkhitis - Entritis hemoragika dan nekrotikan - Perdarahan dan nekrosis pada limpa - Glomerulonefritis - Meningitis
4.	96/N/07	Landrace, 45 hari, 3 kg, sudah divaksinasi CSF, Susut-Bangli	Anoreksia, kemerahan pada kulit, lemas, susah berdiri, tubuh gemetar, sulit bernapas, kurus, diare, bergerombol di pojok kandang.	- Paru-paru dan hati mengalami kongesti - Penebalan pada jantung - Otak dan usus mengalami perdarahan	- Pneumonia interstitialis - Entritis hemoragika dan nekrotikan - Perdarahan dan nekrosis pada limpa - Kongesti di Jantung - Glomerulonefritis-Vaskulitis dan nekrosis neuron di otak
5.	101/N/07	Landrace, 2 bulan, 5 kg, sudah divaksinasi CSF, Payangan-Gianyar	Anoreksia, kebengkakan pada mata, kebiruan pada ujung telinga, inkoordinasi, gangguan pernafasan, suhu tubuh 40,9°C, diare, kelemahan umum seperti sulit berdiri dan babi sering bergerombol di pojok kandang	- Ditemukan perdarahan pada pericardium - Ditemukan adanya akumulasi gas pada lambung dan usus, kongesti pada hati dan perdarahan multifokal pada limpa. - Ditemukan perdarahan pada medula ginjal	- Pneumonia interstitialis - Entritis hemoragika dan nekrotikan - Perdarahan dan nekrosis pada limpa - Perikarditis dan endokarditis - Glomerulonefritis
6.	106/N/07	Landrace, 40 hari, 8 kg, belum divaksinasi CSF, Payangan-Gianyar	Anoreksia, konjungtivitis, eritema pada telinga, punggung dan kaki, demam (41°C), diare kuning kehijauan, inkoordinasi gerak, bergerombol di pojok kandang	- petechie pada limpa dan ginjal	- Pneumonia interstitialis - Entritis hemoragika dan nekrotikan - Perdarahan dan nekrosis pada limpa
7.	113/N/07	Landrace, 60 hari, 8 kg, belum divaksinasi CSF,	Eritema pada telinga, mata bengkak, lemas, inkoordinasi gerak,	- Perdarahan pada selaput meningen dan otak	- Glomerulonefritis - Pneumonia interstitialis

Tabel 1 (lanjutan). Diskripsi, signalemen, gejala klinis, perubahan patologi anatomi, dan histopatologi kasus tersangka CSF di Bali tahun 2007-2008

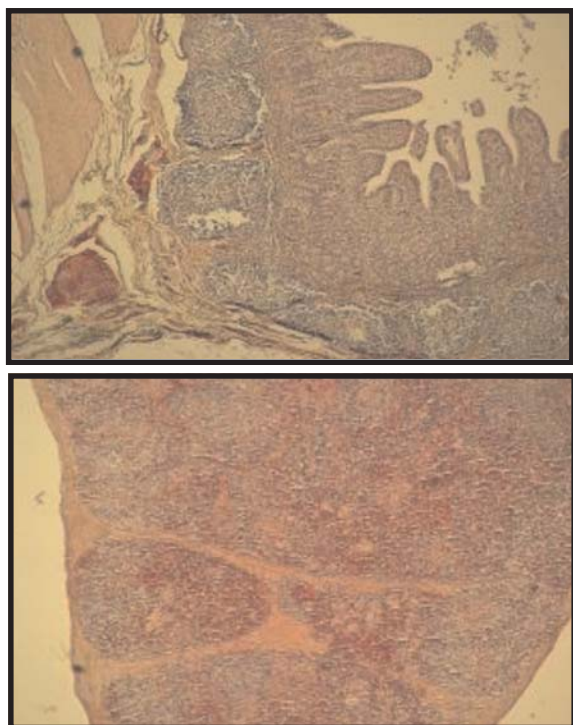
	Tegalalang-Gianyar.	suka bergerombol.	- Perdarahan paru-paru - Perdarahan Usus - Perdarahan mukosa ginjal	- Entritis hemoragika dan nekrotikan - Perdarahan dan nekrosis pada limpa - Glomerulonefritis - Meningo-ensefalitis	
8.	130/N/07 Landrace, 50 hari, 1,5 kg, belum divaksinasi CSF, Perean-Tabanan.	Anoreksia, mata bengkak, eritema pada telinga, kurus, diare kuning encer, pincang dan kaki seperti mendayung sepeda, tremor, suka berbaring dan lemas.	- Kongesti pada otak - perdarahan pada usus dan terdapat <i>button ulcer</i> pada colon	- Pneumonia interstitialis - Entritis hemoragika dan nekrotikan - Perdarahan dan nekrosis pada limpa - Glomerulonefritis - Kongesti otak	
9.	143/N/07 Landrace, 2 bulan, 6 kg, belum divaksinasi CSF, Payangan-Gianyar.	Anoreksia, konjungtivitis, eritema pada telinga, punggung dan kaki, demam (41°C), Diare kekuningan, suka bergerombol di pojok kandang.	- Perdarahan pada otak, paru-paru, usus, hati, ginjal dan limpa	- Pneumonia interstitialis - Entritis hemoragika dan nekrotikan - Perdarahan dan nekrosis pada limpa - Glomerulonefritis - Kongesti otak	
10.	150/N/08 Landrace, 2 bulan, 8 kg, belum divaksinasi CSF, Susut-Bangli	Anoreksia, telinga membiru, kurus, tremor, diare kekuningan, lemah dan inkoordinasi gerak.	- Paru-paru mengalami perdarahan - Hati dan limpa mengalami kebengkakan - Penebalan pada mukosa usus	- Pneumonia interstitialis - Entritis hemoragika dan nekrotikan - Perdarahan dan nekrosis pada limpa - Glomerulonefritis	
11.	168/N/08 Landrace, 3,5 bulan, 10 kg, belum divaksinasi CSF, Suwung-Denpasar	Anoreksia, konjungtivitis, eritema pada ujung telinga, Demam (41°C), mulut mengeluarkan cairan, rebah dengan gerakan mengayuh, inkoordinasi, konstipasi dan gangguan respirasi.	- Ginjal terjadi perdarahan - Limpa bengkak dengan infark kehitaman di tepinya - Usus mengalami perdarahan dan usus besar terdapat radang dipterik membulat (<i>button ulcer</i>)	- Pneumonia interstitialis - Entritis hemoragika dan nekrotikan - Perdarahan dan nekrosis pada limpa - Glomerulonefritis	
12.	203/N/08 Landrace, 3 bulan, 10 kg, belum divaksinasi CSF, Payangan-Gianyar	Anoreksia, kemerahan pada permukaan kulit, demam (41,1°C), diare berdarah, inkoordinasi pada kaki belakang.	- Perdarahan di usus-Limpa mengalami pembesaran	- Pneumonia interstitialis - Entritis hemoragika dan nekrotikan - Perdarahan dan nekrosis pada limpa	

dua dari tiga kasus dapat menghasilkan produk dengan panjang antara 600-700 bp yang sama tinggi dengan kontrol positif, sementara pita serupa tidak tampak pada kontrol negatif. Hasil sekuensing pendahuluan untuk konfirmasi produk PCR diperoleh sekuens cDNA sepanjang 406 basa. Sekuens tersebut telah diregistrasi di *GeneBank* dengan Acc. No. HM 366152 Penelusuran BLAST (*basic local allignment search tool*) sekuens yang diperoleh pada *GeneBank* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) menunjukkan bahwa sekuens

tersebut khas protein E2 virus CSF. Isolat tersebut mempunyai homologi terdekat dengan virus CSF strain GS-LX dari Cina (Acc. No. AF143087) dengan homologi 98%. Hasil analisis filogenetik protein E2 virus CSF Isolat Udayana-1/07 dibandingkan dengan beberapa isolat CSF dari seluruh dunia yang diperoleh dari *GeneBank* ditampilkan pada Gambar 4. Hasil tersebut menunjukkan isolat dimaksud berkerabat dekat dengan berbagai isolat asal Cina dan bukan dari negara lain seperti Korea, Prancis, Swiss, atau Amerika Serikat.

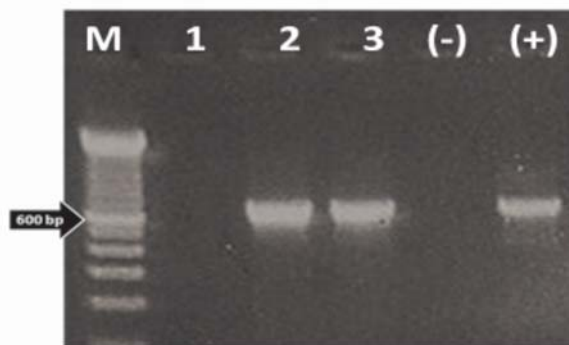


Gambar 1. Perubahan patologi anatomi ulkus kancing (*button ulcer*) pada kolon kasus No. 59/N/07.



Gambar 2. Foto preparat histologi usus (atas) dan limpa (bawah) dari kasus No. 59/N/07. Tampak nekrosis dan deplesi epitel dan jaringan limfoid usus (atas) serta deplesi limfosit, kerusakan arsitektur, dan perdarahan pada limpa (bawah). Pembesaran 100X, pewarnaan HE.

Dalam kajian ini, proporsi kasus tersangka yang dapat dikonfirmasi dengan RT-PCR hanya 58%. Sisanya tetap dianggap tersangka CSF karena gambaran klinik, patologi, dan histopatologi pada kasus negatif tidak dapat dibedakan dengan kasus terkonfirmasi.

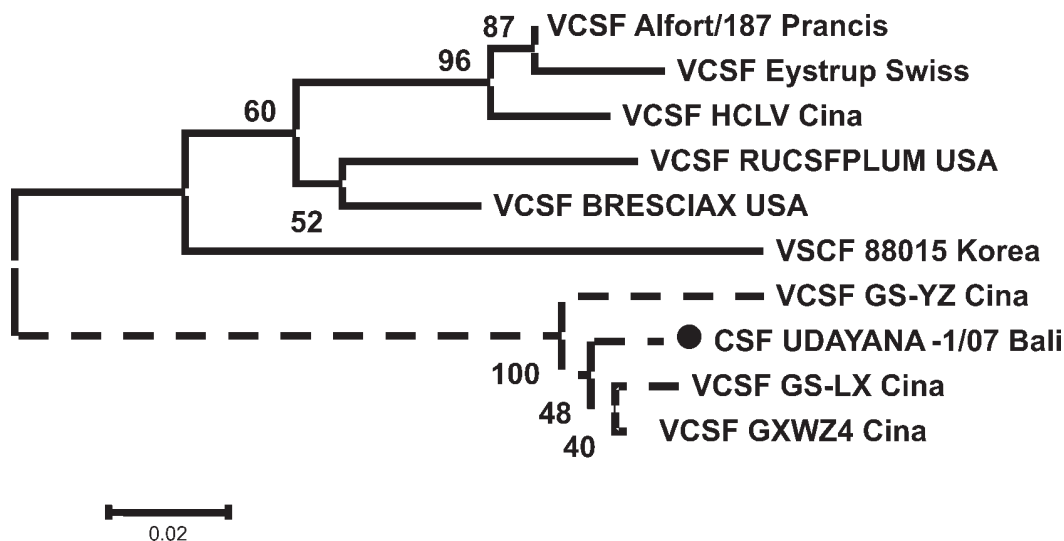


Gambar 3. Gambar Gel Agarose 2% yang Diwarnai dengan Etidium Bromida dari Hasil RT-PCR Tiga Kasus Tersangka CSF dari Bali 2007-2008. Jalur M adalah 100-bp ladder (Invitrogen). Posisi pita 600 bp ditunjukkan dengan tanda panah. Jalur 1, 2, dan 3 adalah sampel ka-sus 106/N/07, 59/N/07, dan 168/N/08. (-) adalah control negatif dari total RNA limpa babi yang baru lahir. (+) adalah control positif dari total RNA vaksin CSF komersial.

Tabel 2. Hasil RT-PCR pada masing-masing kasus tersangka CSF di Bali tahun 2007-2008

No	Kode Kasus	Hasil
1	59/N/07	+
2	64/N/07	+
3	69/N/07	+
4	96/N/07	+
5	101/N/07	+
6	106/N/07	-
7	113/N/07	+
8	130/N/07	-
9	143/N/07	-
10	150/N/08	-
11	168/N/08	+
12	203/N/08	-

Sensitifitas teknik RT-PCR yang diaplikasikan dalam kajian ini tidak dapat diungkap karena teknik baku dengan kultur pada biakan sel dan deteksi Flourescence Antibody Technique, seperti dipaparkan di atas, tidak tersedia. Walaupun demikian protokol yang diterapkan pada kajian ini terbukti spesifik. Salah satu produk RT-PCR telah dapat dikonfirmasi sebagai protein E2 virus CSF. Kajian sekuens isolat CSF yang lain sedang dikerjakan, sehingga keragaman genetik virus CSF dari Bali dapat diungkap.



Gambar 4. Pohon filogenetik protein E2 virus CSF Isolat Udayana-1/07 (lingkaran biru) dibandingkan dengan beberapa isolat CSF dari seluruh dunia yang diperoleh dari GeneBank. Negara asal diterangkan di belakang nama isolat. Kluster genetik dimana isolat asal Bali berada ditandai dengan garis putus berwarna biru. Persentase cabang replikasi dalam 1000 replikat ditunjukkan dengan angka di dekat cabang yang bersangkutan. Jarang genetik dikalkulasi dengan the Kimura 2-parameter method (Kimura, 1980). Analisis filogenetik dilakukan dengan program MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007).

Analisis filogenetik menunjukkan bahwa sekuens dari satu kasus terkonfirmasi berkerabat dekat dengan isolat CSF asal Cina yang tersedia di GeneBank (Gambar 4). Hasil ini mengindikasikan bahwa virus CSF diintroduksi yang bersirkulasi di Bali berasal dari Cina. Untuk menguji dugaan tersebut, variasi genetik virus CSF di Bali perlu dipelajari dengan isolat yang lebih banyak. Kajian tentang variasi genetik dan antigenik virus CSF tidak banyak dilaporkan. Satu publikasi dari Cina (Li *et al.*, 2006) mengindikasikan bahwa virus CSF mempunyai keragaman genetik yang cukup luas, yaitu antara 0,2-10,5% pada tingkat asam amino. Pengetahuan tentang keragaman genetik virus CSF merupakan dasar ilmiah yang penting untuk rekomendasi galur vaksin yang paling tepat digunakan oleh peternak.

SIMPULAN

Virus CSF dapat dikonfirmasi pada 7 kasus dari 12 tersangka (58%). Sekuens cDNA dari salah satu isolat dapat dikonfirmasi sebagai gen penyandi protein E2 dengan homologi 98% dengan salah satu isolat asal Cina yang didokumentasi di *GeneBank*.

SARAN

Perlu dilakukan kajian lebih lanjut terhadap virus CSF yang ada di Indonesia khususnya di Bali untuk mengungkap sensitivitas RT-PCR, mengklarifikasi beberapa diagnosa banding, dan keragaman genetica virus yang ada dilapangan sehingga nanti dapat direkomendasikan galur vaksin yang tepat digunakan oleh peternak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penghargaan disampaikan kepada mahasiswa FKH Universitas Udayana yang kasus koasistensi diagnostik laboratorium dipaparkan dalam tulisan ini.

DAFTAR PUSTAKA

Artois M, Depner K R, Guberti V, Hars J, Rossi S, Rutili D. 2002. Classical Swine Fever (Hog Cholera) in Wild boar in Europe. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epi* 2., 21 (2), 287-303.
 de Smit A J. 2000. Laboratory diagnosis, epizootiology, and efficacy of marker vaccines in classical swine fever: a review. *Vet Q* 22(4):182-8.

- EU (European Union). 2002. Commission decision of 1 February 2002 approving a Diagnostic Manual establishing diagnostic procedures, sampling methods and criteria for evaluation of the laboratory tests for the confirmation of classical swine fever (2002/106/EC). *Official Journal of the European Union*, L39/71.
- Fenner FJ, Gibbs EPJ, Murphy FA, Rott R, Studdert MJ, White DO. 1993. *Veterinary Virology*. 2nd Ed. San Diego, California. Academic Press.
- Gregg D. 2002. Update on classical swine fever (hog cholera). *J Swine Health Prod* 10(1) : 33-37.
- Handel K, Helen K, Kevin H, John P, 2004. Comparison of reverse transcriptase-polymerase chain reaction, virus isolation, and immunoperoxidase assays for detecting pigs infected with low, moderate, and high virulent strains of classical swine fever virus. *J Vet Diagn Invest* 16:132-138.
- Harding MJ, Isabelle P, Carlos MG, Robert AH, José R, Richard M, Gilles CD, Soopayah V, 1996. Evaluation of nucleic acid amplification methods for the detection of hog cholera virus. *J Vet Diagn Invest* 8: 414-419.
- Hongzhuan W, Yee-Wai C, Kit-Man W, Frederick CL. 2005. Molecular identification of hog cholera viruses from southern China. *J of anim and vet advances* 4(5): 497-501.
- Kaden V, Elke L, Anja F, Jens P T, 2007. Value of skin punch biopsies for the diagnosis of acute classical swine fever. *J Vet Diagn Invest* 19:697-701.
- Kencana GAY, Asmara W, Tabbu CR, Mahardika IG NK, 2008. Amino terminus gen polymerase basik 2 virus avian influenza subtipe H5N1 asal berbagai spesies hewan di Indonesia. *J. Vet.* 9 (3): 107-114.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J of Mol Evolution* 16:111-120.
- Li X., Xu Z, He Y, Yao Q, Zhang K, Jin M, Chen H, Qian P. 2006. Genome comparison of a novel classical swine fever virus isolated in China in 2004 with other CSFV strains. *Virus Genes*: 33(2): 133-142.
- McGoldrick A, Lowings JP, Ibata G, Sands JJ, Belak S, Paton DJ. 1998. A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (Taq Man). *J Virol Methods* 72: 125-135.
- Mulas JMDL, Ruiz-Villamor E, Donoso E, Quezada M, Lecocq C, dan Sierra MA, 1997. Immunohistochemical detection of hog cholera viral glycoprotein 55 in paraffin-embedded tissues. *J Vet Diagn Invest* 9:10-16.
- OIE, 2008. *Classical swine fever (hog cholera) dalam OIE Terrestrial Manual*. www.oie.int. hal. 1092-1106.
- Paton DJ, McGoldrick A, Greiser-Wilke I, Parchariyanon S, Song J-Y, Liou PP, Stadejek T, Lowings JP, Bjorklund H, Belak S, 2000. Genetic typing of classical swine fever virus. *Veterinary Microbiology* 73, 132-137.
- Suartha IN, Mahardika IG NK, Candra Dewi IAS, Nursanty KD, Kote YLS, Handayani AD, Suartini GAA. 2008. Penerapan teknik Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction untuk peneguhan diagnosis penyakit Distemper pada anjing. *Jurnal Veteriner*, Vol.9 No.1: 25-32.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10.1093/molbev/msm092.