

Studi Bio-Molekuler Virus Penyakit Jembrana: Sebagai Dasar Pengembangan Tissue Culture Vaksin

*(BIO-MOLECULAR STUDY OF JEMBRANA VIRUS:
AS BASIC DEVELOPMENT OF TISSUE CULTURE VACCINE)*

I Wayan Masa Tenaya

Balai Besar Veteriner Denpasar

Jln. Raya Sesetan No.266, Sesetan, Denpasar-Bali, Email: *masatenaya62@yahoo.co.id*

ABSTRAK

Patogenesis dan bio-molekuler virus penyakit Jembrana (JDV) hanya menyerang B-cells sebagai target selnya, sehingga antibodi (kekebalan humoral) tidak terbentuk sampai 2-3 bulan pasca infeksi. Peningkatan populasi CD8+ T-cells secara signifikan dan menurunnya CD4+ T-cells secara drastis selama fase akut berakibat turunnya rasio CD8:CD4 yang menyebabkan meningkatnya kepekaan hewan terhadap infeksi sekunder. Sembilan ekor sapi bali yang digunakan dalam penelitian ini dikelompokkan berdasarkan status infeksi terkait pengambilan sampel. Tujuh ekor diinfeksi dengan JDV isolate Tabanan/87 dan 2 ekor lainnya diinfeksi dengan BIV isolate R29, sebagai kontrol negatif (Non-JDV infected cattle). Sampel diuji terhadap identitas selular dan target sel, kekebalan selular dan ekspresi sitokin. Sampel diuji dengan uji Flow cytometry dan dianalisis dengan uji varian. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perubahan sub-populasi sel-sel T terkait penyembuhan infeksi JDV memperkuat peranan kekebalan selular dalam proses kesembuhan penyakit Jembrana. Bukti-bukti atas meningkatnya ekspresi gen-gen sitokin yang diproduksi oleh sel-sel T CD8 terutama, IFN- γ dan IL-2, mengindikasikan pentingnya gen-gen ini dalam proses infeksi dan kesembuhan.

Kata kunci: virus penyakit jembrana, sapi bali, sitokin dan in vitro

ABSTRACT

Phatogenesis and bio-molecular of jembrana disease virus (JDV) only attack B-cell as a target, causing no produced antibody until 2-3 months post infection. Significantly increasing the number of CD8+ T-cells and significantly decreasing of CD4+ T-cells during acute phase affecting in decreased of CD8+:CD4+ ratio, that resulting in increasing sensitifity of animal to secunder infection. Nine bali cattle used in this study grouped based on infection status related to sample collected. Seven bali cattle infected by JDV isolate Tabanan/87 and two other cattle infected by BIV isolate R29, as a negative control (Non-JDV infected cattle). Samples tested of cellular identity and targeted cell, cellular immunity and cytokine expressions. Samples tested by flow cytometry and analyzed by variance. The result showed that the change of T-cell sub-population related to recovery of JVD infection strengthen the role of cellular immunity in a process of healing Jembrana disease. Evidences of enhancement of cytokine gene expressions produced by CDB T-cell mainly by IFN- γ and IL-2, indicated the importance of those genes in an infection process and recovery.

Keywords: Jembrana disease virus, bali cattle, cytokine and in vitro

PENDAHULUAN

Sapi bali, merupakan plasma nutfah Indonesia yang penting dalam industri daging (Martoyo, 2003; Wiryosuhanto, 1996). Ternak ini populasinya sangat

tinggi (sekitar 2,6 juta dari sekitar 5,3 juta total populasi sapi) dan tersebar di beberapa daerah terutama Bali, Sumatra, Kalimantan, Sulawesi and Maluku (Talib *et al.*, 2002). Disamping keunggulan yang dimiliki, sapi bali sangat peka

terhadap penyakit Jembrana dan ini menjadi kendala utama dalam industri daging di Indonesia. Kerugian akibat penyakit jembrana dapat berupa kerugian ekonomi (kematian, nilai jual turun, pengobatan, nilai kerja hewan menurun) dan terhambatnya penyebaran sapi bali dari daerah endemis ke daerah bebas yang memerlukan pemeliharaan sapi bali.

Penyebab utama penyakit ini sudah diidentifikasi sebagai bovine lentivirus, disebut Jembrana disease virus (JDV) (Chadwick *et al.*, 1995a) dan penemuan ini memungkinkan sejumlah penemuan lanjutan yang sangat berguna untuk meningkatkan pemahaman reaksi sapi bali terhadap infeksi JDV. Dalam penelitian terdahulu banyak aspek pathogenesis penyakit Jembrana belum diteliti, khususnya target sel dan respon immunopathologi. Karena gambaran histologi tentang reaksi proliferasi hebat di daerah “non-follicular (*T-cell*) pada jaringan limfoid dan gambaran haematologi tentang lymphopenia, yang menjadi ciri khas penyakit jembrana (Soesanto *et al.*, 1990), maka ada asumsi bahwa JDV mungkin menyerang T-cells (Dharma *et al.*, 1991; Dharma *et al.*, 1994), walaupun teman dekat JDV, BIV adalah menyerang multi sel (Heaton *et al.*, 1998).

Di dalam paper ini akan dipaparkan hasil penelitian tentang (1) identitas selular terhadap infeksi JDV dan target sel JDV, yang sangat penting terkait upaya pembuatan vaksin kutur jaringan (tissue culture vaccine), (2) hasil studi tentang kekebalan selular untuk mengungkap status kesembuhan mayoritas (80%) hewan terinfeksi pada saat phase kritis (akut) dimana belum terbentuknya antibodi dan (3) hasil studi tentang peranan gene “Cytokine” untuk mengungkap keterlibatan gen dalam kesembuhan penyakit Jembrana, yang secara keseluruhan bertujuan mempelajari aspek ilmiah terkait pembuatan vaksin kutur jaringan.

MATERI DAN METODA

Penelitian Identitas Selular Dan Target Sel.

Sembilan ekor sapi bali yang digunakan dalam penelitian ini dikelompokkan berdasarkan status infeksi terkait pengambilan sampel (Tabel 1). Tujuh ekor diinfeksi dengan JDV isolate Tabanan/87 dan 2 ekor lainnya diinfeksi dengan BIV isolate R29, sebagai kontrol negatif (Non-JDV infected cattle). Jenis dan jumlah sampel yang diteliti mewakili semua sistem organ yang diambil dari hewan pada saat infeksi akut dan dalam keadaan normal (Tabel 2). Reagensia biologis yang digunakan meliputi “primary polyclonal” atau “monoclonal antibodies” dan “secondary monoclonal antibodies” yang didapat dari beberapa sumber (Tabel 3). Uji yang digunakan meliputi Immunohistokimia (IHK), Double Immunostaining (DS), Insitu hybridisasi (ISH).

Table 1. Hewan dan phase infeksi ketika pengambilan sample dilakukan

Kode hewan	Isolat Virus	Waktu pengambilan sampel
CB10, CB212	JDVTab/87	Phase demam (Demam hari ke 2)
CB203, CB205, CB206, CB208, CB.210	JDVTab/87	Phase pasca demam (5-6 hari pasca infeksi)
CB198, CB199	BIV-R29	42 hari pasca infeksi (kontrol negatif)

Table 2. Jenis dan jumlah sample jaringan yang diambil

Sistim organ	Jenis jaringan
Saraf pusat	Otak besar
Pernapasan	Paru-paru
Pencernaan	Pancreas, hati, rumen, reticulum, omasum, abomasum, duodenum, jejunum, ilium dan colon
Lymphoretikuler	Spleen, lymph nodes (prescapular, retropharyngeal, mediastinal, mesenteric), tonsil, thymus
Haematopoietic	Jantung and sumsum tulang
Reproduksi	Ovaries, uterus dan kelenjar mammary
Urinaria	Kantong kencing, ginjal dan anak ginjal

Penelitian Kekebalan Selular

Lima sapi bali digunakan dalam penelitian ini juga diinfeksi dengan JDV isolat Tab/87 seperti di atas (point 1). Sampel darah diambil setiap hari selama 21 hari pasca infeksi dan hari ke 21 hewan dibunuh. Tabung steril mengandung EDTA (Greiner Bio-One) digunakan untuk mengambil sample darah untuk pemurnian sel darah putih

(limposit) menggunakan Ficoll-Paque plus (Amersham Biosciences). Sampel limposit ini juga disiapkan untuk studi ekspresi “cytokine” yang dijelaskan pada point 3. Reaksi pewarnaan dilakukan dengan pewarnaan tidak langsung memakai antibodi dan penanda selular (Tabel 4). Sampel diuji dengan uji Flow cytometry dan dianalisa dengan uji statistik ANOVA.

Table 3. Daftar reagen biologis yang digunakan.

Antibodi	Antigen specificity	IgG isotype	Reactivity in cells	Konsentrasi antibodi
MAb BD2	JDV capsid (CA)	IgG1 kappa	Cytoplasmic	N/A
Anti-human CD3 (F7.2.38)	T-cell	N/A	Surface nor cytoplasmic	0.6 mg/ml
CD79 $\alpha\gamma$ (HM57)	B-cell	IgG1 kappa	Cytoplasmic	0.25 mg/ml
MAC387	Macrophage	IgG1 kappa	Cytoplasmic	0.375 mg/ml
Rabbit anti-bovine IgG	Whole molecule bovine IgG			2.4 mg/ml

Table 4. “Primary and secondary antibodies” yang digunakan untuk uji “flow cytometry”

Antibody	Source	Isotype / clone	Cat./Lot No
Primary antibody			
Mouse anti-bovine CD4	Serotec	IgG2a/CC8	MCA1653G
Mouse anti-bovine CD8	Serotec	IgG2a/CC63	MCA1653G
Mouse anti-bovine CD21	Santa Cruz	IgG2b/CC51	SC-101835
Secondary antibody			
Goat anti-mouse	Invitrogen	Alexa Fluor 488	A-11029

Penelitian Ekspresi Sitokin

Jumlah, jenis hewan dan sample limposit yang digunakan dalam penelitian ini sama dengan untuk penelitian flow cytometry. Total RNA dari limposit diisolasi dengan kit isolasi RNA. Jenis dan jumlah gene yang diteliti disesuaikan dengan dugaan keterlibatan gene tersebut dalam infeksi JDV (Tabel 5). Pemilihan primer untuk sitokin genes IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α and FN- γ , and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) sebagai kontrol internal didapat dari publikasi sebelumnya (Konnai *et al.*, 2003; Leutenegger *et al.*, 2000).

Tabel 5. Sekuven primers dan spesifikasinya untuk real-time RT-PCR.

Gene	Primer sequences (5'-3') (forward & reverse)	Length	
		Primer (bp) ^a	Product (bp)
IL-1 α b	GATGCCTGAGACACCCAA	18	173
	GAAAGTCAGTGATCGAGGG TTT TAC GTC CCC AAG	19	
IL-2b	GTT AA	20	217
	CGT TTA CTG TTG CATCATCA	20	
IL-6 b	TCCAGAACGAGTATGAGG	18	236
	CATCCGAATAGCTCTCAG TCTTCTAAGCCTCAAGTAA CAAGT	18	
TNF- α c	CCATGAGGGCATTGGCATA	N/A	103
	C TGGATATCATCAAGCAAGA CATGTT		
INF- γ c	ACGTCATTCATCATCACTTT	N/A	151
	CATGAGTTC GGCGTGAACCACGAGAAGT		
GAPDH c	ATAA	N/A	120
	CCCTCCACGATGCCAAAAGT GGGAGACCCCGTCAGATG		
JDV pold	TGGA	N/A	121
	TGGGAAGCATGGACAATC AG		

Keterangan :

a bp: base pairs

b Konnai *et al.* (2003).

c Leutenegger *et al.* (2000).

d Stewart *et al.* (2005).

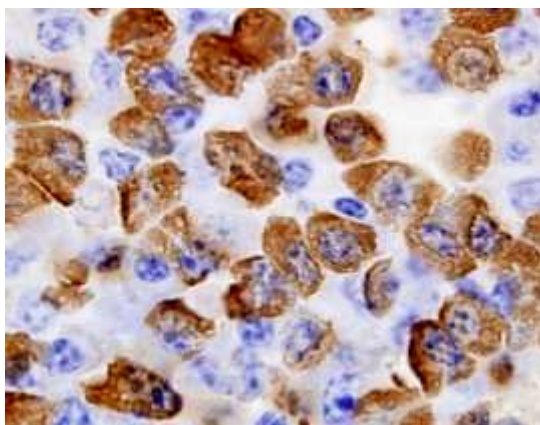
Semua sekwen primer (Table 5) dikonfirmasi dengan evaluasi BLASTIN

program (Zhang and Madden, 1997). Sedangkan primers untuk RNA JDV didapat dari publikasi tentang RT-PCR untuk penyakit Jembrana (Stewart *et al.*, 2005). Sampel kemudian diuji dengan “Real Time PCR” sesuai prosedur dan protocol yang di dapat dari publikasi diatas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian Identitas Selular Dan Target Sel.

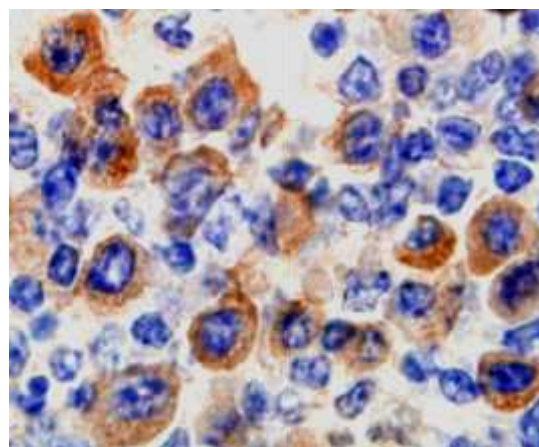
Dari pengujian terhadap sel-sel B, sel-sel T, sel-sel dentritik dan sel-sel macrophage, menggunakan penanda sel yang spesifik diketahui bahwa dengan menggunakan antibodi monoclonal anti JDV, sel sel yang positif JDV (gambar 1) pada jaringan limpa sangat mirip dengan sel sel B dewasa (sel sel plasma) yang diidentifikasi dengan penanda sel plasma (gambar 2). Jadi identitas sel sel yang mengandung/positif JDV hanya mirip terhadap sel sel B dewasa (sel plasma) dan sama sekali tidak menyerupai sel lainnya.



Gambar 1. Sel positif JDV

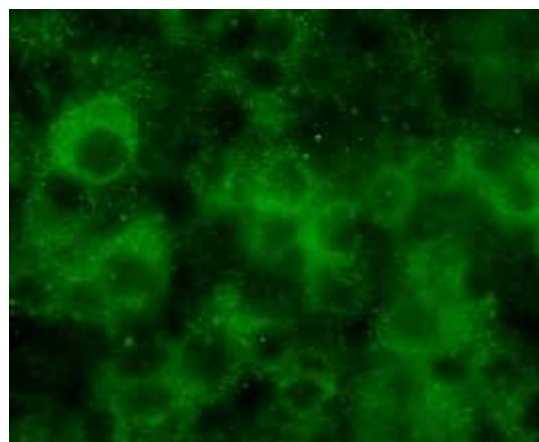
Dengan pengujian “double staining” ternyata sel sel plasma (gambar 3) dan sel sel positif JDV (gambar 4) menjadi positif ganda (gambar 5) yang mengindikasikan bahwa JDV menginfeksi. Reaksi ini tidak terjadi pada sel sel T (gambar 6) dan sel sel macrophage (gambar 7). Positif ganda ditandai dengan warna kuning yang

merupakan kombinasi gabungan antara warna merah (positif JDV) dengan warna hijau (positif sel B, T atau nacrophage).

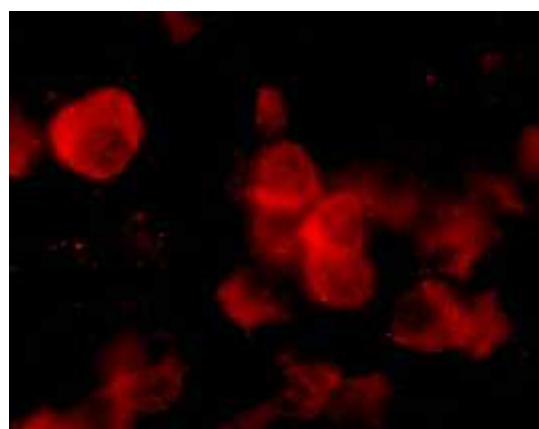


Gambar 2. Sel B dewasa (sel plasma)

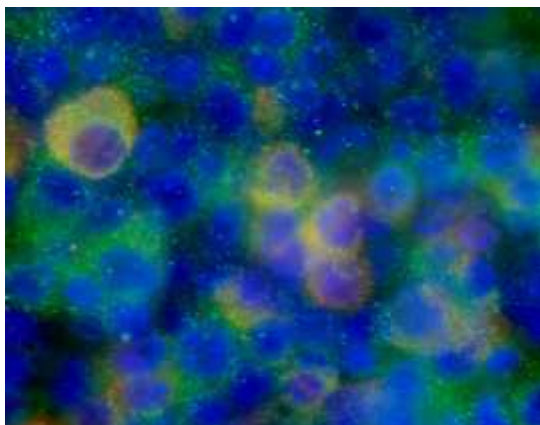
Keberadaan JDV-RNA dengan uji ISH juga terdeteksi pada sel yang mirip sel sel plasma yang mendukung kuat bahwa JDV menginfeksi sel plasma (gambar 7).



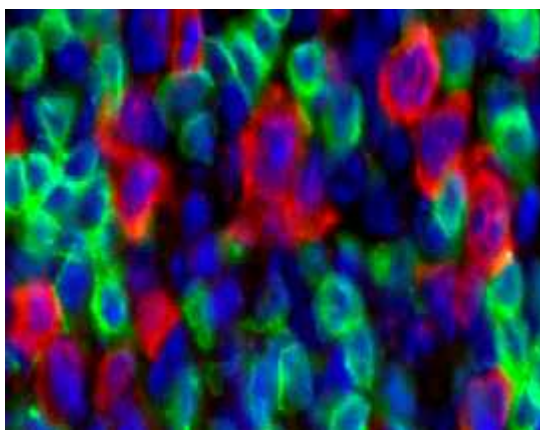
Gambar 3. Sel-sel plasma



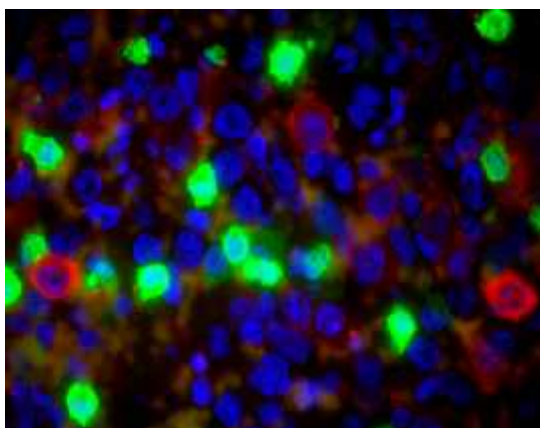
Gambar 4. Sel-sel positif JDV



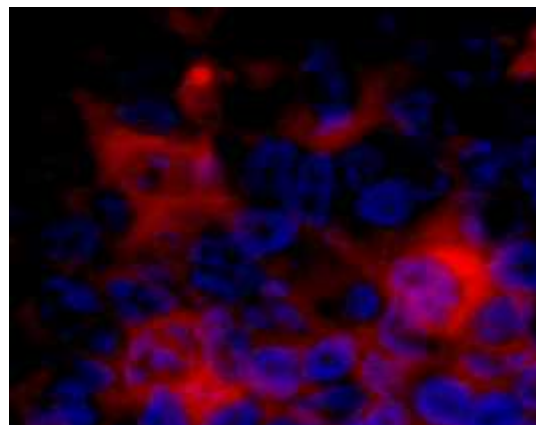
Gambar 5. Merger 3 dan 4 (positif ganda)



Gambar 6. Sel-sel T (Tidak terinfeksi JDV)



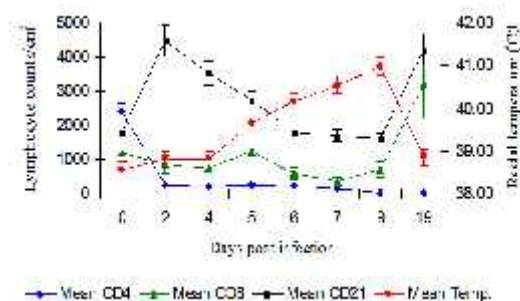
Gambar 7. sel macrophage (Tidak terinfeksi JDV)



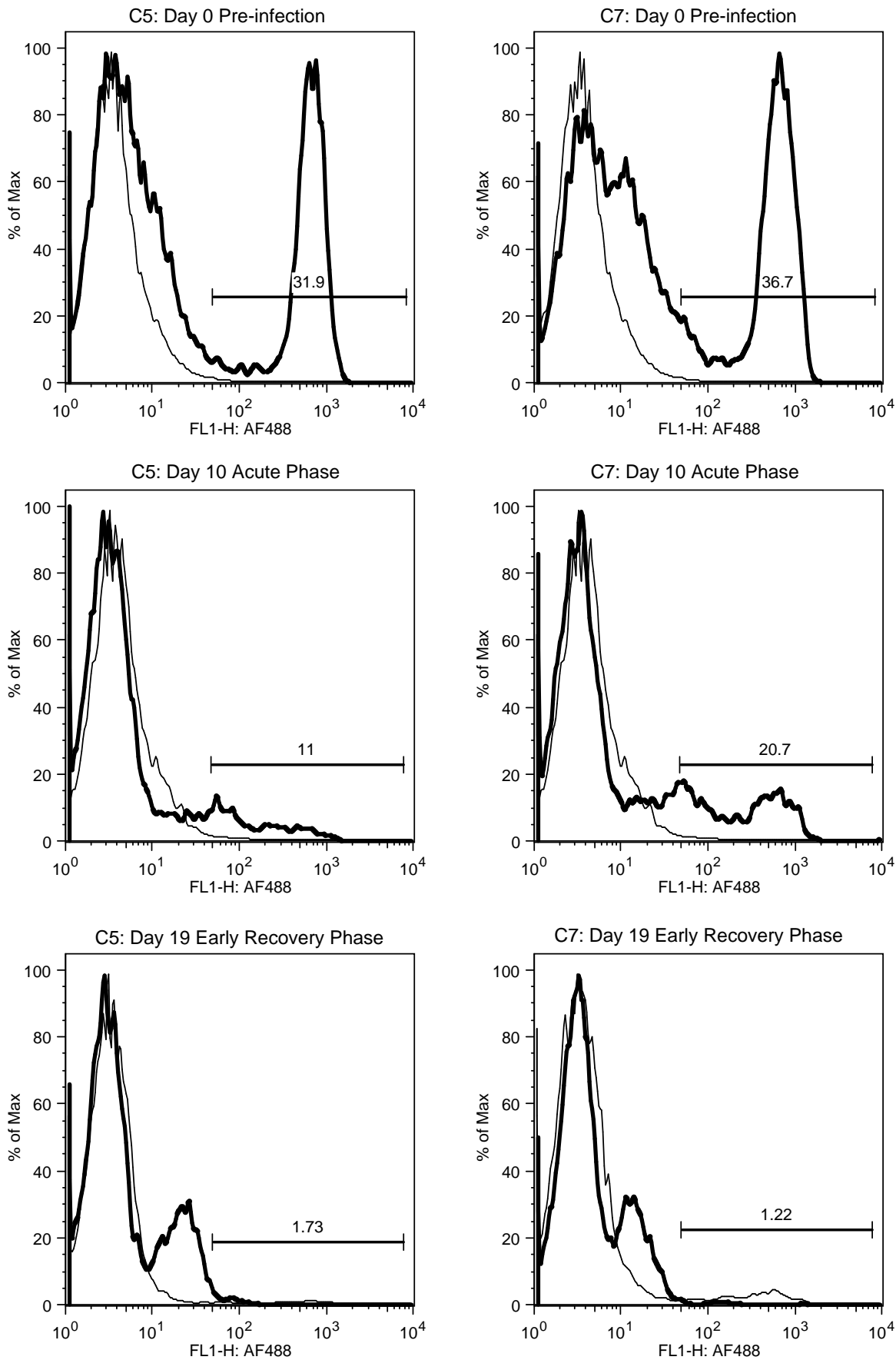
Gambar 8. Sel positif JDV-RNA (Sel-sel mirip sel B terinfeksi JDV)

Penelitian Kekebalan Selular

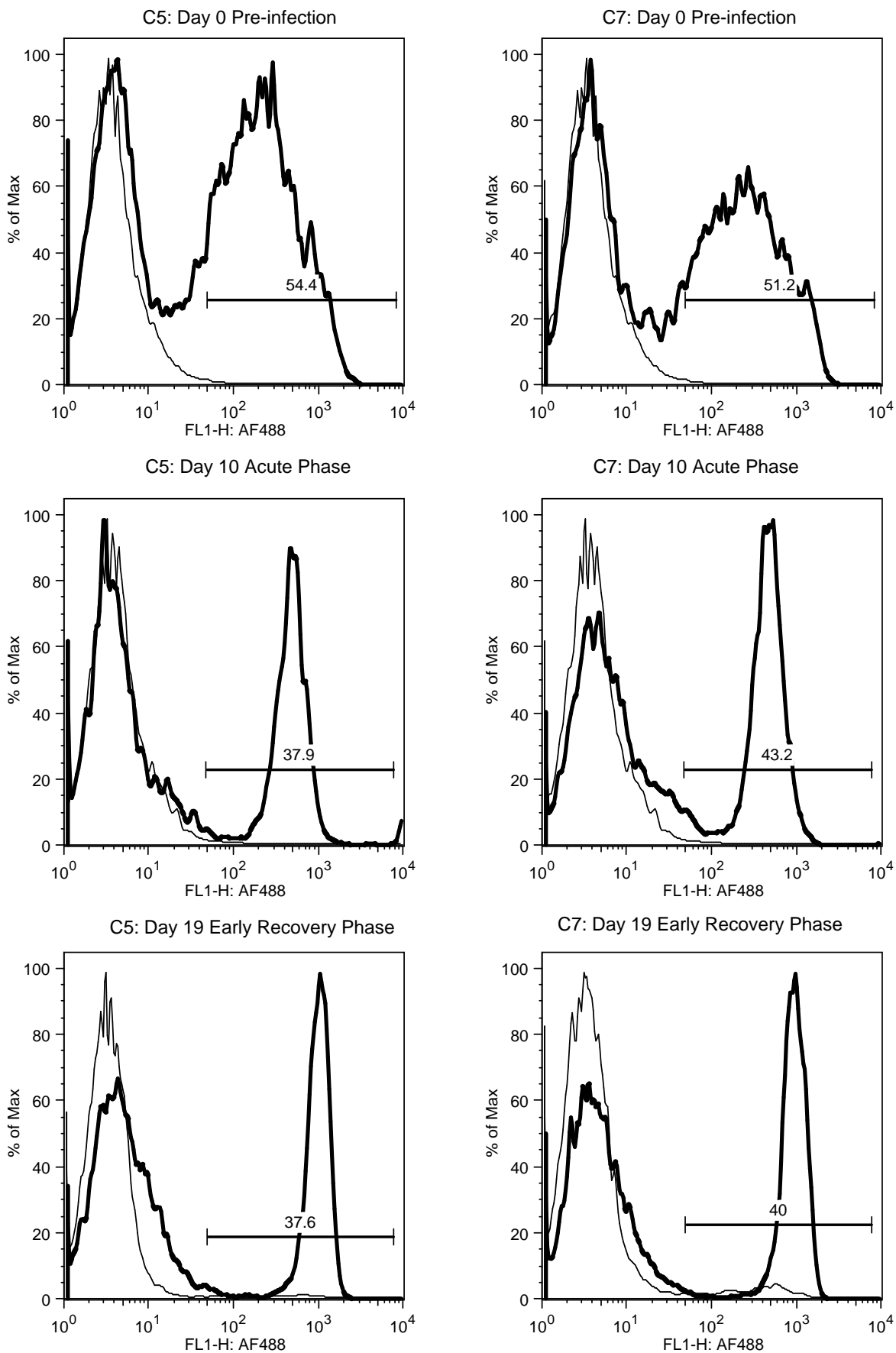
Selama phase akut semua komponen limposit menurun, namun menjelang kesembuhan sel T CD4, tetap menurun drastis sedangkan sel B dan sel T CD8 meningkat tajam. Fluktuasi populasi limposit terjadi secara significant selama infeksi JDV (Gambar 9). Uji flow cytometry menunjukkan bahwa terjadi fluktuasi populasi limposit selama infeksi JDV (Gambar 10a,b,c).



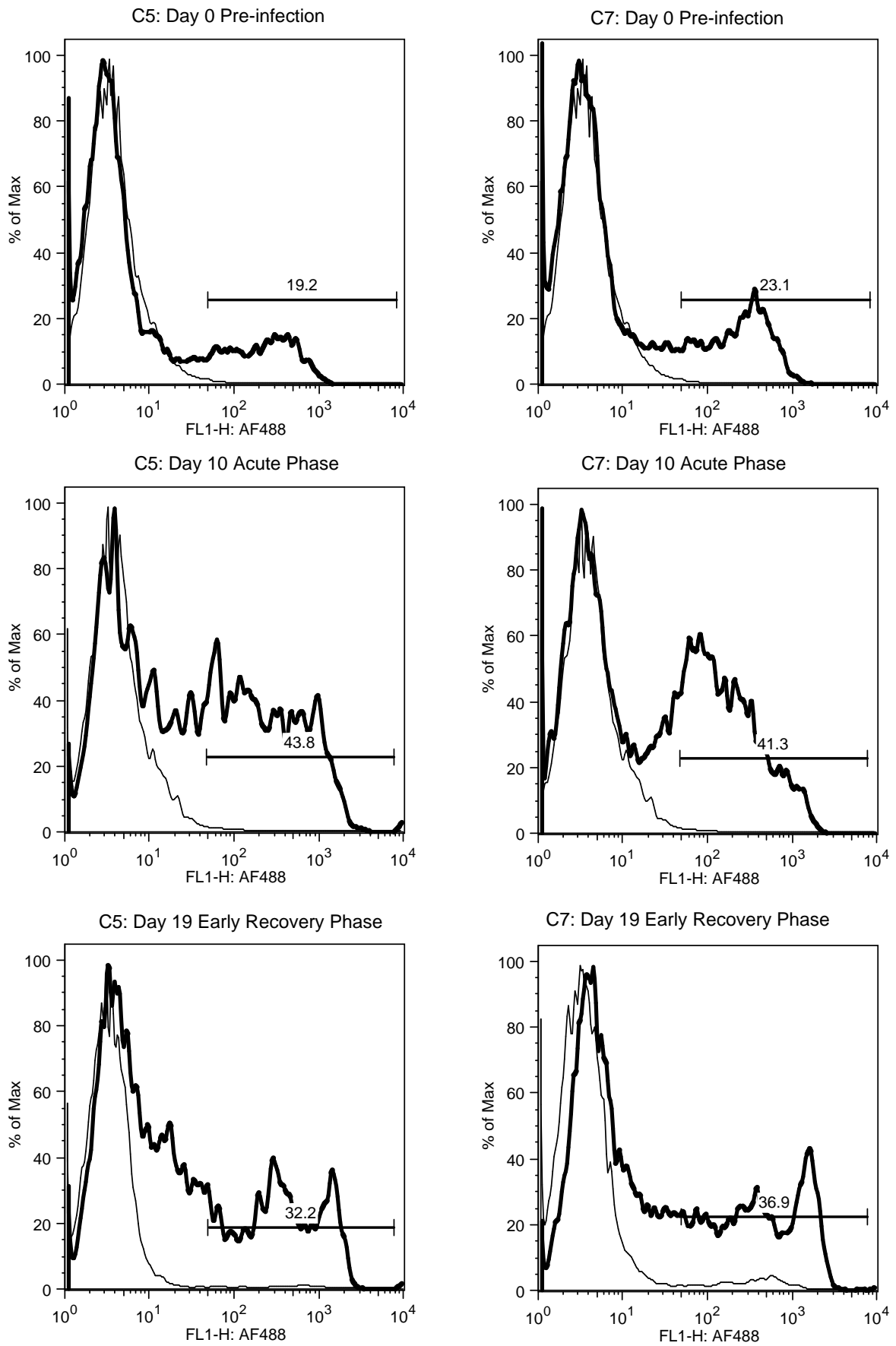
Gambar 10. Fluktuasi limposit selama infeksi JDV. Selama demam (akut) semua komponen limposit menurun tajam terutama sel T CD4 dan sel T CD8. Tetapi pada awal kesembuhan hanya sel T C4 yang tetap dibawah normal secara significant ($p < 0.05$) sedangkan sel lainnya meningkat tajam secara significant ($p < 0.05$).



Gambar 10a. Penurunan sel sel T CD4 secara significant selama infeksi JDV.



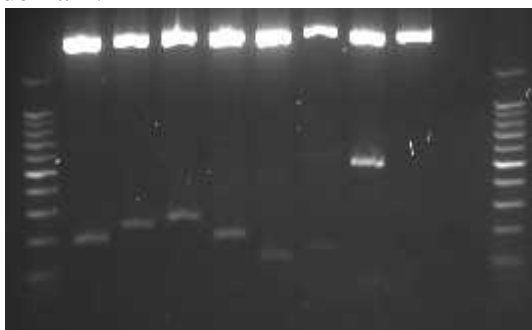
Gambar 10b. Peningkatan sel-sel T CD8 secara significant selama infeksi JDV.



Gambar 10c. Fluktuasi sel B CD21 selama infeksi JDV.

Penelitian Ekpresi Sitokin

Konfirmasi keberhasilan kloning di analisa dengan agarore gel (gambar 11) dan keberhasilan amplifikasi cDNA untuk pembuatan “standard curve” yang diperlukan dalam uji Real Time PCR (RT-PCR) dilakukan dengan uji PCR (gambar 12). Spesifisitas hasil/produk PCR dikonfirmasi dengan sekwensing (gambar 13). Uji RT PCR menunjukkan bahwa gene IL-2, INF-gamma dan TNF-alpha (Gambar 14a,b,c) terekpresi secara significant ($p < 0.05$) selama dan setelah demam.



Gambar 11. Konfirmasi kloning.



Gambar 12. Konfirmasi amplifikasi cDNA

1. GENE ID: 280943 TNF|tumor necrosis factor(TNFsuperfamily, member 2) [Bos taurus] (Over 10 PubMed links) Score = 91.6 bits (49), Expect = $1e-15$ Identities = 49/49 (100%), Gaps = 0/49 (0%) Strand=Plus/Plus
Query 29
TCTCCGGGGCAGCTCCGGTGGTGG
GACTCGTATGCCAATGCCCTCATG
G 77

|||||

Sbjct 330

TCTCCGGGGCAGCTCCGGTGGTGG
GACTCGTATGCCAATGCCCTCATG
G 378

2. GENE ID: 281237 IFNG | interferon, gamma [Bos taurus] (Over 10 PubMed links)

Score = 104 bits (114), Expect = $3e-19$
Identities = 58/59 (98%), Gaps = 0/59 (0%) Strand=Plus/Plus

Query 16

TGNACTCATCAAAGTGATGAATGA
CCTGTGCGCCAAAATCTAACCTCAG
AAAGCGGAAGA 74

|||||

Sbjct 40

TGAACTCATCAAAGTGATGAATGA
CCTGTGCGCCAAAATCTAACCTCAG
AAAGCGGAAGA 46

3. GENE ID: 280822 IL2 | interleukin 2 [Bos taurus] (10 or fewer PubMed links)

Score = 255 bits (282), Expect = $5e-65$
Identities = 167/180 (92%), Gaps = 3/180 (1%) Strand=Plus/Plus

Query 8

ATGTTAAGAGTTTACTTGAAGAA-
TCAA-
CTTCTAGAGGAAGTGCTAAATTAA
GCTCCAA 65

|||||

Sbjct 234

ATCTTAAGTGTTTACTAGGAAGAAC
TCAAACCTTAGAGGAAGTGCTAA
ATTTAGCTCCAA 293

Query 66

GCACAAAGG-
GAAACCCAGAGAGATCAAGGATTC
AATGGACAATATCAACCGAATCGT
TT 124

|||||


Sbjct 294

GCAAAAACCTGAACCCAGAGAG
ATCAAGGATTCAATGGACAATATC
AAGAGAATCGTTT 353

Query 125

TGGAACACTACAGGGATCTGAAACAA
GATTCACATGTGAATATGATGATG
CAACAGTAAACG 184

|||||

Sbjct 354
 TGGAACTACAGGGATCTGAAACAA
 GATTCACATGTGAATATGATGATG
 CAACAGTAAACG 413
 4. gb|EU276071.1|  Bos taurus
 interleukin 6 (IL6) mRNA,complete cds
 Length=641 GENE ID: 280826 IL6 |
 interleukin 6 (interferon, beta 2) [Bos
 taurus] (10 or fewer PubMed links)
 Score=320 bits (354), Expect=3e-84
 Identities = 177/177 (100%), Gaps=0/177
 (0%) Strand=Plus/Plus
 Query 26
 CAGAACACTGATCCAGATCCTGAA
 GCAAAGATCGCAGATCTAATAAC
 CACTCCAGCCAC 85
 |||
 Sbjct 446
 CAGAACACTGATCCAGATCCTGAA
 GCAAAGATCGCAGATCTAATAAC
 CACTCCAGCCAC 505
 Query 86
 AAACACTGACCTGCTGGAGAAGAT
 GCAGTCTTCAAACGAGTGGGTAAA
 GAACGCAAAGAT 145
 |||
 Sbjct 506
 AAACACTGACCTGCTGGAGAAGAT
 GCAGTCTTCAAACGAGTGGGTAAA
 GAACGCAAAGAT 565
 Query 146
 TATCCTCATCCTGAGAACCTTGA
 GAATTCCTGCAGTTCAGCCTGAG
 AGCTATTCG 202
 |||
 Sbjct 566
 TATCCTCATCCTGAGAACCTTGA
 GAATTCCTGCAGTTCAGCCTGAG
 AGCTATTCG 622

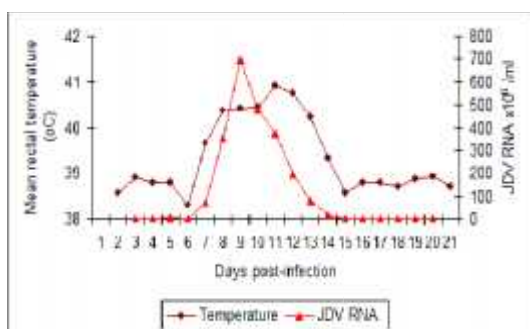
Gambar 13. Hasil sekwensing produk PCR untuk konfirmasi homologi terhadap “bovine cytokine genes”. Prosentase homologi (92% to 100%) dengan referen standard ditunjukkan.

Hasil penelitian terbaru dalam sejarah penelitian penyakit Jembrana. Identitas selular dan target sel diketahui bahwa proliferasi selular hebat yang

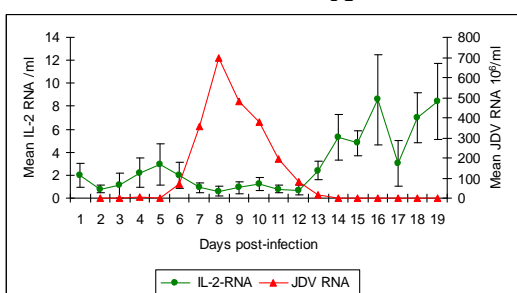
terjadi di daerah T sel dalam jaringan limfoid selama fase akut sebetulnya bukan disebabkan oleh akumulasi populasi sel T seperti diasumsikan sebelumnya (Dharma *et al.*, 1991), melainkan karena infiltrasi sel B muda (centroblast-like cells) yang mengekspresi IgG dan terindikasi sebagai sel yang memproduksi antibodi. Infeksi JDV yang ditunjukkan oleh immunoperoxidase test (uji IHK), memperlihatkan bahwa JDV terdeteksi di dalam sel sel yang secara morfologi dan distribusinya sama dengan sel sel B muda (centroblast-like cells) dan bukan di dalam sel-sel T atau sel-sel macrophage. Hasil/bukti ini dikuatkan oleh hasil uji “double-immunolabelling” yang biasa digunakan oleh para ahli lainnya untuk mendeteksi sel target suatu mikroorganisma (Espinoza and Kuznar, 2009; Mason *et al.*, 2000). Kecocokan antara sel sel yang positif JDV dengan sel sel positif IgG yang ditunjukkan oleh test “immunofluorescent” mendukung fakta sel sel positif JDV adalah sebenarnya sel sel B yang memproduksi antibodi.

Perbedaan mendasar proses penyakit pada infeksi JDV dengan infeksi lentivirus lainnya (Soesanto *et al.*, 1990), khususnya terkait fase akut dan stabilitas JDV selama ini (Desport *et al.*, 2007), predileksi JDV untuk menginfeksi hanya sel sel B dan bukan sel sel T atau sel sel macrophage dari kebanyakan lentivirus lainnya tidaklah sesuatu yang aneh. Sel sel B sebagai sel target JDV dapat menjelaskan menurunnya populasi sel-sel B muda di daerah follicular (Dharma *et al.*, 1991) dan terlambatnya produksi antibodi sampai 2-3 bulan pasca infeksi (Hartaningsih *et al.*, 1994; Wareing *et al.*, 1999). Adalah sangat logik bahwa proses normal produksi antibodi terganggu karena terinfeksi dan matinya sel sel B. Kedua BIV dan JDV secara genetika relatif stabil dan mutasi viral relatif rendah dari genom lentiviral lainnya terkait dengan sel target dari

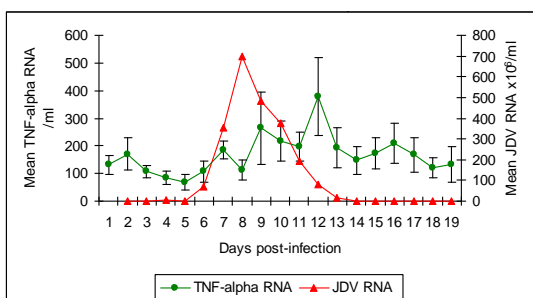
virus ini untuk sel sel plasma dengan masa hidup yang relatif lama (Carpenter *et al.*, 2000; Desport *et al.*, 2007).



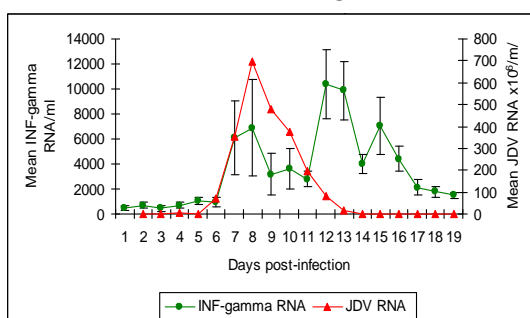
A



B



C



D

Gambar 14 (A,B,C,D) Uji RT PCR menunjukkan peningkatan viral load pada phase akut, dan peningkatan ekspresi gene IL-2, INF-gamma dan TNF-alpha selama demam dan pada awal phase kesembuhan dari infeksi JDV.

Tidak ada bukti bahwa sel sel macrophage diinfeksi JDV mungkin

menjelaskan tidak adanya gejala klinis syaraf pada penyakit Jembrana. Gejala syaraf yang dilaporkan pada pasient positif HIV biasanya dikaitkan dengan infeksi sel sel microglia (Gonzalez-Scarano and Martin-Garcia, 2005) dan juga pada infeksi SIV, adanya gejala syaraf dikaitkan dengan terdeteksinya monosit/macrophage positif SIV di jaringan otak (Bissel *et al.*, 2008).

Bukti predileksi JDV terhadap sel sel B dewasa (sel plasma) dan tidak hidup di dalam sel sel T atau sel sel macrophage adalah unik dan tidak dilaporkan pada lentivirus lainnya. Walaupun beberapa lentivirus juga menginfeksi sel sel B tapi juga menginfeksi sel sel lainnya, misalnya BIV menginfeksi sel sel B, T dan monocytes (Heaton *et al.*, 1998), SIV menginfeksi sel sel CD4+ and CD8+ T-cells, macrophages dan sel sel B in vivo (O'Neil *et al.*, 1999), dan HIV-1 menginfeksi sel sel CD4+ T-cells, macrophages and sel sel dendritik, walaupun tidak jelas terkait infeksi langsung kepada sel sel B (Clapham and McKnight, 2002; Conge *et al.*, 1998; Muro-Cacho *et al.*, 1995; Shirai *et al.*, 1992). Lentivirus lain yang juga menyebabkan infeksi akut tapi tidak menyerang sel sel B seperti: EIAV pada kuda menyerang sel sel macrophage (Murakami *et al.*, 1999; Oaks *et al.*, 1998) dan SIVsmmPBj14 pada kera hanya menginfeksi sel sel macrophages. Adalah sangat penting untuk menentukan reseptor JDV dan penyebarannya kepada sel sel lain yang mungkin menjelaskan mengapa hanya sapi bali yang peka terhadap infeksi JDV (Soeharsono *et al.*, 1990).

Untuk memahami mekanisme kesembuhan mayoritas hewan terinfeksi (80%) setelah infeksi JDV telah dilakukan analisa limposit dengan uji flow cytometry. Hasil ini mendukung terjadinya lymphopenia pada infeksi JDV, salah satu ciri khas hematologi infeksi JDV pada phase akut (Soesanto *et*

al., 1990) adalah karena disebabkan oleh penurunan populasi sel sel T CD4+ dan CD8+. Karena JDV terlihat tidak menginfeksi sel T (CD3) adalah mungkin bahwa proses penurunan sel sel T pada infeksi JDV mungkin sama dengan yang terjadi pada infeksi EIAV pada kuda dimana juga terjadi penurunan populasi sel sel T CD4 walupun sel-sel ini bukan target EIAV. Kejadian ini dijelaskan bahwa infeksi tidak langsung dari partikel atau bagian virus EIAV terhadap selsel T CD4 menyebabkan populasi sesel tersebut turun tajam (Murakami *et al.*, 1999). Penurunan drastis CD4+ pada penyakit Jembrana sepertinya mendukung terjadinya immunosuppressi dan infeksi sekunder seperti haemorrhagic septicaemia, sebagai dilaporkan pada penyakit Jembrana (Dharma *et al.*, 1994).

Ekspansi hebat sel-sel CD3+ T-cells di jaringan limphoid selama demam cocok dengan peningkatan populasi sel-sel T CD8+ sesuai hasil uji flow cytometry. Penyebab utama kejadian ini tidak diketahui secara pasti. Pada infeksi akut SIVsmmPBj14, gene Nef diduga bertanggung jawab sebagai mitogenik yang mengaktifkan limposit (Stephens *et al.*, 1998), dan walaupun gene nef tidak ditemukan pada JDV, sebuah gene tmx ditemukan dilokasi yang sama dengan nef pada lentiviruses primata (Chadwick *et al.*, 1995b) dan mungkin mengekspresi sebuah protein yang berfungsi sebagai Nef.

Peningkatan populasi sel-sel T CD8 yang terjadi segera setelah demam turun mungkin berkaitan dengan kesembuhan mayoritas (80%) hewan yang terserang JDV (Soesanto *et al.*, 1990). Hal ini juga berkaitan dengan resistensi hewan yang pernah terinfeksi JDV terhadap infeksi ulangan dan tidak kambuhnya penyakit Jembrana dari hewan yang sudah sehat (Soeharsono *et al.*, 1990). Meningkatnya populasi sel-sel T CD8 juga dilaporkan pada pasien HIV-1 yang tidak

menunjukkan gejala klinis (Copeland *et al.*, 1995; Zagury *et al.*, 1998), dan oleh infeksi SIV pada kera walaupun gagal mengeradikasi virus dari tubuhnya (Migueles *et al.*, 2002; Pantaleo *et al.*, 1997a). Karena peningkatan populasi sel-sel T CD8 terkait kesembuhan alamiah pada infeksi JDV, diduga kuat bahwa sel-sel tersebut menghasilkan zat-zat biologis untuk mengontrol JDV. Adalah sangat penting untuk melanjutkan penelitian ini untuk menjawab kinetic respon kesembuhan ini.

Penelitian *in vivo* yang dilakukan berhasil mengungkap perubahan ekspresi sitokin selama infeksi JDV. Meningkatnya ekspresi IFN- γ mRNA menggunakan RT-PCR berkorelasi positif dengan peningkatan ekspresi protein IFN- γ yang dideteksi dengan ELISA. Walaupun kit yang sama tidak digunakan untuk mendeteksi hubungan antara mRNA dengan ekspresi protein dari sitokin yang lainnya, hal ini diasumsikan bahwa kejadiannya mungkin saja sama. Meningkatnya ekspresi mRNA terjadi utamanya terhadap IL-2 and IFN- γ dibawah regulasi Th1 (Abbas *et al.*, 1996). Peningkatan populasi sitokin IL-2 dan IFN- γ berkorelasi positif dengan meningkatnya populasi sel-sel T CD8 darah tepi, yang menguatkan bukti tambahan bahwa sel-sel ini mengalami peningkatan regulasi (up-regulation) secara *in vivo* dan memperkuat aksi cytikines tersebut dalam membantu proses kesembuhan. Peningkatan yang sama antara sitokin IL-2 dan IFN- γ diduga berperan dalam menghilangkan kejadian "persistent lymphocytosis" pada infeksi Bovine leukaemia virus (Kabeya *et al.*, 1999). Penelitian lanjutan yang lebih intensif perlu dilakukan untuk mengetahui sifat kinetic dan durasi sitokin yang telah diteliti dan sitokin terkait lainnya tidak hanya dari darah tepi tetapi juga dari dalam jaringan untuk meningkatkan pengertian tentang peranan

sitokins dalam respon penyakit dan kesembuhan.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perubahan sub-populasi sel-sel T terkait penyembuhan infeksi JDV memperkuat peranan kekebalan seluler (cell-mediated immune response) dalam proses kesembuhan penyakit Jembrana. Bukti bukti atas meningkatnya ekspresi gen-gen sitokin yang diproduksi/dilepaskan oleh sel-sel T CD8 terutama, IFN- γ and IL-2, mengindikasikan pentingnya gen gen ini dalam proses infeksi dan kesembuhan.

Saran

Peranan penting sel-sel B dalam pathogenesis infeksi JDV membuka alur pengetahuan kita untuk lebih memahami proses penyakit. Juga menyiapkan jalan alternatif untuk mengkultivasi JDV secara *in vitro* untuk keperluan pengembangan vaksin hidup (tissue culture vaccines).

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih Kepala Balai Besar Veteriner Denpasar atas kesempatan yang diberikan untuk melakukan penelitian, serta pihak-pihak yang telah banyak membantu dalam proses penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383:787-793.

Bissel SJ, Wang G, Bonneh-Barkay D, Starkey A, Trichel AM, Murphey-Corb M, Wiley CA. 2008. Systemic and brain macrophage infections in relation to the development of

simian immunodeficiency virus encephalitis. *J Virol*, 82: 5031-5042.

Carpenter S, Vaughn EM, Yang J, Baccam P, Roth JA, Wannemuehler Y. 2000. Antigenic and genetic stability of bovine immunodeficiency virus during long-term persistence in cattle experimentally infected with the BIV(R29) isolate. *J Gen Virol*, 81: 1463-1472.

Chadwick BJ, Coelen RJ, Sammels LM, Kertayadnya G, Wilcox GE, (1995a). Genomic sequence analysis identifies Jembrana disease virus as a new bovine lentivirus. *J Gen Virol*, 76: 189-192.

Chadwick BJ, Coelen RJ, Wilcox GE, Sammels LM, Kertayadnya G. 1995b. Nucleotide sequence analysis of Jembrana disease virus: a bovine lentivirus associated with an acute disease syndrome. *J Gen Virol*, 76: 1637-1650.

Clapham PR, McKnight A. 2002. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J Gen Virol*, 83: 1809-1829.

Conge AM, Tarte K, Reynes J, Segondy M, Gerfaux J, Zembala M, Vendrell JP. 1998. Impairment of B-lymphocyte differentiation induced by dual triggering of the B-cell antigen receptor and CD40 in advanced HIV-1-disease. *Aids*, 12: 1437-1449.

Copeland KF, McKay PJ, Rosenthal KL. 1995. Suppression of activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by CD8+ T cells is not lentivirus specific. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 11: 1321-1326

Desport M, Stewart ME, Mikosza AS, Sherida CA, Peterson SE, Chavand O, Hartaningsih N, Wilcox GE. 2007. Sequence analysis of

- Jembrana disease virus strains reveals a genetically stable lentivirus. *Virus Res*, 126: 233-244.
- Dharma DM, Budiantono A, Campbell RS, Ladds PW. 1991. Studies on experimental Jembrana disease in Bali cattle. III. Pathology. *J Comp Pathol*, 105: 397-414.
- Dharma DM, Ladds PW, Wilcox GE, Campbell RS. 1994. Immunopathology of experimental Jembrana disease in Bali cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 44: 31-44.
- Espinoza JC, Kuznar J. 2009. Visualization of the infectious pancreatic necrosis virus replication cycle by labeling viral intermediates with a TUNEL assay. *Vet Microbiol*.
- M. (1989). Identification and biologic characterization of an acutely lethal variant of simian immunodeficiency virus from sooty mangabeys (SIV/SMM). *AIDS Res Hum Retroviruses*, 5: 397-409.
- Gonzalez-Scarano F, Martin-Garcia J. 2005. The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol* 5: 69-81.
- Hartaningsih N, Wilcox GE, Kertayadnya G, Astawa M. 1994. Antibody response to Jembrana disease virus in Bali cattle. *Vet Microbiol*, 39: 15-23.
- Heaton PR, Johnstone P, Brownlie J. 1998. Investigation of the cellular tropism of bovine immunodeficiency-like virus. *Res Vet Sci*, 65, 33-40.
- Kabeya H, Ohashi K, Oyunbileg N, Nagaoka Y, Aida Y, Sugimoto C, Yokomizo Y, Onuma M. 1999. Up-regulation of tumor necrosis factor alpha mRNA is associated with bovine-leukemia virus (BLV) elimination in the early phase of infection. *Vet Immunol Immunopathol*, 68: 255-265.
- Konnai S, Usui T, Ohashi K, Onuma M. 2003. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. *Vet Microbiol*, 94: 283-294.
- Leutenegger CM, Alluwaimi AM, Smith WL, Perani L, Cullor JS. (2000). Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol*, 77: 275-287.
- Martojo H. 2003. A simple selection program for smallholder Bali cattle farmers. In *Strategies to improve Bali cattle in Eastern Indonesia*, pp. 43-53. Edited by K. Entwistle and D. R. Lindsay: Australian Centre for International Agricultural Research.
- Mason DY, Micklem K, Jones M. 2000. Double immunofluorescence labelling of routinely processed paraffin sections. *J Pathol*, 191: 452-461.
- Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, Hallahan CW, Van Baarle D, Kostense S, Miedema F. 2002. HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol*, 3: 1061-1068.
- Murakami K, Sentsui H, Shibahara T, Yokoyama T. 1999. Reduction of CD4+ and CD8+ T lymphocytes during febrile periods in horses experimentally infected with equine infectious anemia virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 67: 131-140.
- Muro-Cacho CA, Pantaleo G, Fauci AS. 1995. Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV-infected persons. Intensity of apoptosis correlates with the general state of activation of the lymphoid tissue and not with stage

- of disease or viral burden. *J Immunol*, 154: 5555-5566.
- Oaks JL, McGuire TC, Ulibarri C, Crawford TB. 1998. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. *J Virol*, 72: 7263-7269.
- O'Neil SP, Mossman SP, Maul DH, Hoover EA. 1999. In vivo cell and tissue tropism of SIV_{smmPBj14-bcl.3}. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 15: 203-215
- Pantaleo G, Soudeyns H, Demarest JF, Vaccarezza M, Graziosi C, Paolucci S, Daucher M, Cohen OJ, Denis F. (1997a). Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8⁺ T cell clones during primary HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9848-9853.
- Pantaleo G, Demarest JF, Schacker T, Vaccarezza M, Cohen OJ, Daucher M, Graziosi C, Schnittman SS, Quinn TC. 1997b. The qualitative nature of the primary immune response to HIV infection is a prognosticator of disease progression independent of the initial level of plasma viremia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 254-258.
- Shirai A, Cosentino M, Leitman-Klinman SF, Klinman DM. 1992. Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation. *J Clin Invest*, 89: 561-566.
- Soeharsono S, Hartaningsih N, Soetrisno M, Kertayadnya G, Wilcox GE. 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.
- Soesanto M, Soeharsono S, Budiantono A, Sulistyana K, Tenaya M, Wilcox GE. 1990. Studies on experimental Jembrana disease in Bali cattle. II. Clinical signs and haematological changes. *J Comp Pathol*, 103: 61-71.
- Stephens EB, Mukherjee S, Liu ZQ, Sheffer D, Lamb-Wharton R, Leung K, Zhuge W, Joag SV, Li Z. 1998. Simian-human immunodeficiency virus (SHIV) containing the nef/long terminal repeat region of the highly virulent SIV_{smmPBj14} causes PBj-like activation of cultured resting peripheral blood mononuclear cells, but the chimera showed no increase in virulence. *J Virol*, 72, 5207-5214.
- Stewart M, Desport M, Hartaningsih N, Wilcox G. 2005. TaqMan real-time reverse transcription-PCR and JDVp26 antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay to quantify Jembrana disease virus load during the acute phase of in vivo infection. *J Clin Microbiol*, 43: 5574-5580.
- Talib C, Entwistle K, Sirega A, Budiarti-Turner S, Lindsay D. 2002. Survey of population and production dynamics of Bali cattle and existing breeding programs in Indonesia. In In proceeding of an Aciar Workshop on "Strategies to Improve Bali Cattle in eastern Indonesia". Denpasar-Bali-Indonesia.
- Wareing S, Hartaningsih N, Wilcox GE, Penhale WJ. 1999. Evidence for immunosuppression associated with Jembrana disease virus infection of cattle. *Vet Microbiol*, 68: 179-185.
- Wiriyosuhanto S. 1996. Bali cattle -their economic important in Indonesia. In Workshop on Jembrana Disease and the Bovine Lentiviruses pp. 34-41. Edited by G. E. Wilcox S, Soeharsono, Dharma DMN, Copland

- JW. Australian Centre for International Agricultural Research.
- Zagury D, Lachgar A, Chams V, Fall LS, Bernard J, Zagury JF, Bizzini B, Gringeri A, Santagostino E. .1998.. C-C chemokines, pivotal in protection against HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3857-3861.
- Zhang J, Madden TL. 1997. PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res*, 7: 649-656.