

Real Time Polymerase Chain Reaction : Perangkat Diagnostic Alternatif untuk Melacak Virus Nipah

*(REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION :
AN ALTERNATIVE DIAGNOSTIC TOOL TO DETECT NIPAH VIRUS)*

**Indrawati Sendow., Atik Ratnawati,
Raden Mas Abdul Adjid, Muharam Saepulloh**

Bagian Virologi, Balai Besar Penelitian Veteriner.
Jl. RE Martadinata No. 30 Bogor 16114
Telp. 0251 8334456, Emai : balitvet@indo.net.id

ABSTRAK

Nipah merupakan penyakit zoonosis berbahaya yang dapat menimbulkan dampak sosial, ekonomis dan psikologis. Kalong *Pteropus sp.* merupakan salah satu *reservoir host* nipah. Mengingat virus nipah termasuk dalam kategori virus zoonosis yang sangat berbahaya dan dapat berakibat fatal bagi manusia, pekerjaan yang menggunakan virus hidup harus dilakukan di laboratorium dengan tingkat keamanan 4 (Biosafety Level 4 - BSL4). Untuk dapat dilakukan di laboratorium yang tidak memiliki fasilitas BSL4, maka sebagai pengganti deteksi virus nipah dilakukan dengan menggunakan uji *Real time Polymerase Chain Reaction*. Hasil positif dengan uji realtime PCR, diteguhkan oleh *Australian Animal Health Laboratory (AAHL)* Geelong, Australia, menunjukkan bahwa virus nipah telah terdeteksi dari *swab* saliva kalong *P. vampyrus* asal Medan, Sumatera Utara.

Kata-kata kunci: virus nipah, zoonosis, deteksi virus, *real time PCR*, kalong

ABSTRACT

Nipah is a dangerous zoonotic disease with a high social, economical and psychological impact. Fruit bat *Pteropus sp.* is one of the nipah virus *reservoir host*. As the virus is categorized as a dangerous zoonotic disease that cause fatal in human, all works related to live virus should be conducted in a laboratory with BSL4 facilities. The detection of nipah virus using *real time PCR* to replace virus isolation can therefore be conducted in a laboratory without BSL4 facilities. The results was further confirmed at reference laboratory at *Australian Animal Health Laboratory (AAHL)* Geelong, Australia, indicated that nipah virus can be detected in saliva of fruit bat *P. vampyrus* in Medan North Sumatera.

Key words: Nipah virus, zoonosis, viral detection, Real Time PCR, fruitbats.

PENDAHULUAN

Virus nipah (NiV) adalah salah satu virus yang tergolong sangat patogen bagi ternak babi dan manusia. (Calisher *et al.*, 2005). Virus nipah yang termasuk dalam genus *paramyxo* (Daniels *et al.*, 2001; Wild *et al.*, 2008), muncul di Malaysia pada tahun 1998, dan menyebabkan wabah respirasi pada babi, yang selanjutnya dapat menyerang manusia dengan mortalitas tinggi. Setelah kejadian di Malaysia tahun 1998, wabah nipah kembali muncul dan menyebabkan kematian pada manusia di Banglades selama tahun 2001, 2003, 2005, 2005,

2007 dan 2008 (Luby *et al.*, 2006; Lo dan Rota, 2008) dan India pada tahun 2001 dan 2007 (Chadha *et al.*, 2006).

Kejadian wabah nipah di Asia selain Malaysia belum pernah dilaporkan, namun secara serologi, antibodi terhadap virus nipah telah terdeteksi pada kalong jenis *Pteropus sp.*, tetapi tidak pada babi, seperti di Cina (Li, 2008), Kamboja (Hsu *et al.*, 2004; Olson *et al.*, 2002), dan Indonesia (Sendow *et al.*, 2008). Deteksi virus nipah pada *Pteropus sp.* juga telah dilaporkan di Malaysia pada *P. hypomenalus* dan *P. vampyrus*, (Chua *et al.*, 2002), di Kamboja pada *P. lylei* (Reynes *et al.*, 2005), di Thailand

pada *P. lylei*, *P. hypomelanus*, *P. vampyrus* (Wacharapluesadee *et al.*, 2005; Wacharapluesadee dan Hemachudha, 2007) dan di Bangladesh pada *P. giganteus* (Hsu *et al.*, 2004). Kalong pemakan buah telah pula dilaporkan berperan sebagai pembawa (*reservoir host*) virus nipah (Diederich dan Meisner, 2007; Lo dan Rota, 2008).

Indonesia merupakan negara kepulauan yang sangat luas, dan bertetangga dekat dengan Malaysia dan Singapura yang endemic tertular virus nipah, untuk itu diperlukan gambaran situasi penyakit nipah. Sendow *et al.*, (2008), melaporkan bahwa secara serologi babi yang ada di Indonesia bebas dari infeksi virus nipah, namun antibodi terhadap virus nipah terdeteksi pada kalong *P. vampyrus* di Provinsi Sumatera Utara (Sendow *et al.*, 2006). Di Indonesia, deteksi virus nipah pada kalong belum pernah dilakukan, baik dengan isolasi virus maupun dengan menggunakan PCR, sementara itu untuk melakukan kegiatan yang berhubungan dengan virus hidup seperti isolasi virus dan uji serum netralisasi, kegiatan tersebut harus dilakukan di laboratorium dengan tingkat keamanan 4 (*Biosafety Level 4 - BSL4*). Di Indonesia, laboratorium dengan fasilitas BSL4 belum ada. Keterbatasan ini menyebabkan penelitian yang menggunakan virus hidup tidak dapat terlaksana, termasuk di antaranya melakukan isolasi virus. Uji *real time PCR*, merupakan metode yang baik yang dapat diterapkan di negara yang tidak mempunyai laboratorium BSL4 dalam melakukan deteksi virus nipah. Uji ini telah banyak diadopsi oleh beberapa negara yang tidak mempunyai laboratorium BSL4 seperti Thailand (Wacharapluesadee dan Hemachudha, 2007).

Virus nipah sangat berbahaya bila menginfeksi manusia (Chua *et al.*, 2000). Di Malaysia dan Singapura, virus nipah telah menewaskan lebih dari 100 orang dan jutaan babi terbunuh (Chua *et al.*, 2002). Setelah sempat mewabah di Malaysia, kasus infeksi virus nipah pada manusia dan babi tidak dilaporkan. Namun, keberadaan antibodi virus nipah pada *Pteropus sp.* di Asia Tenggara seperti Kamboja, Thailand, dan Indonesia telah dilaporkan. Kondisi tersebut mengindikasikan bahwa suatu saat virus nipah dapat mewabah di Asia Tenggara atau Indonesia. Oleh karena itu, perangkat diagnostik virus nipah perlu dipersiapkan sebagai langkah antisipasi, agar wabah infeksi virus nipah dapat dicegah sedini mungkin. Tujuan penelitian ini adalah untuk

menjabarkan bahwa uji *real time PCR* dapat digunakan sebagai perangkat diagnostic untuk mendeteksi virus nipah dan pengerjaannya dapat dilakukan di laboratorium yang tidak memiliki fasilitas BSL4.

METODE PENELITIAN

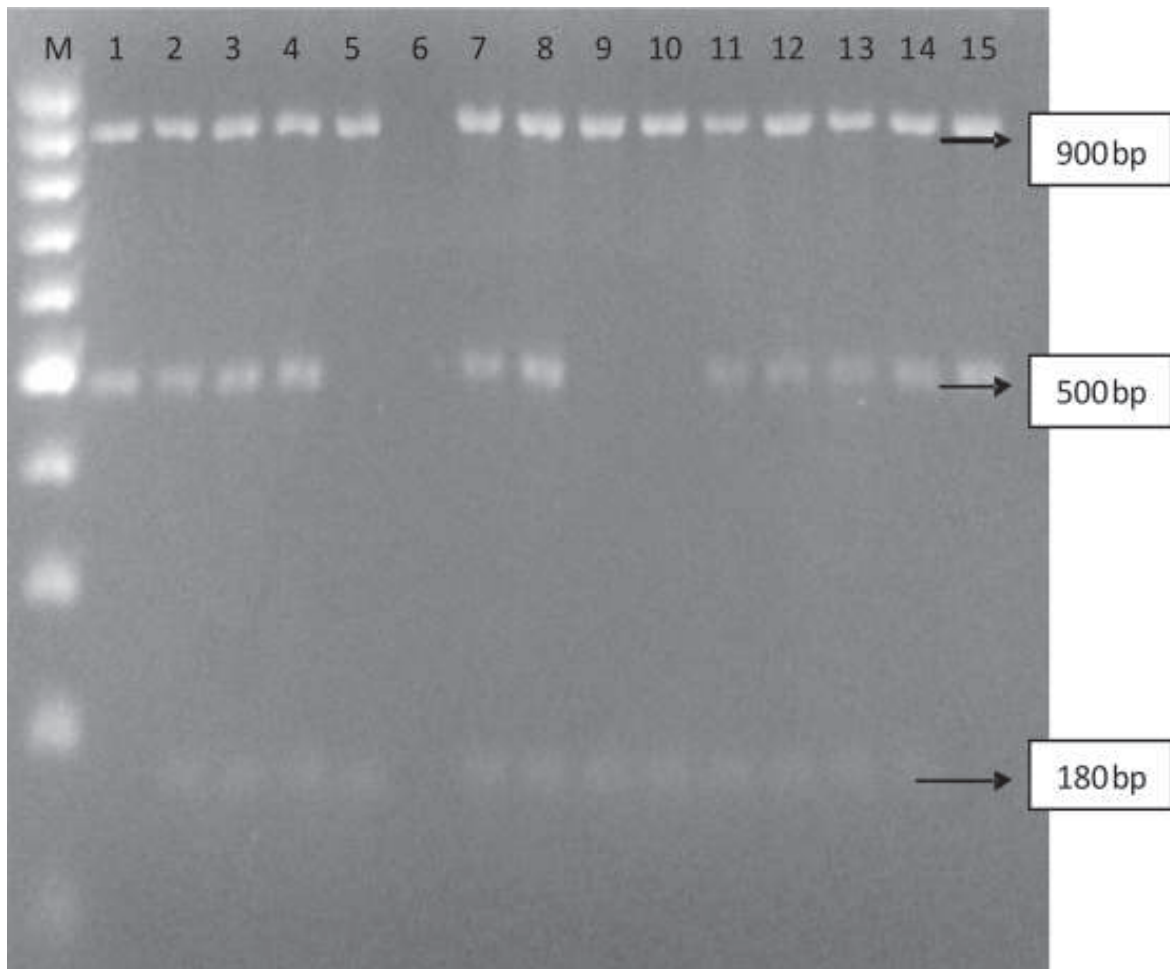
Koleksi Contoh Kalong

Sebanyak 67 *swab* saliva yang diperoleh dari *swab* mulut dan tenggorokan kalong sampel, yang diperoleh dari penjual kalong yang berada di kaki lima atau dari pengumpul kalong di Propinsi Sumatera Utara, digunakan dalam penelitian ini (Tabel 1). Identifikasi kalong yang diperoleh dilakukan berdasarkan panjang lengan kalong, sementara konfirmasi spesies dilakukan oleh pakar kelelawar, Dr Hume Field (komunikasi pribadi), *Department of Agriculture, Fisheries & Forestry, Queensland Australia* (Gambar 1).

Real Time Polymerase Chain Reaction

Isolasi RNA virus dari spesimen lapang. *Swab* saliva yang diperoleh, ditaruh dalam transport media untuk selanjutnya divortek dan disentrifugasi dengan kecepatan 1.500 rpm selama 10 menit untuk memisahkan kotoran dengan supernatan. Terhadap supernatan spesimen kemudian dilakukan isolasi RNA virus nipah. Isolasi RNA virus dilakukan dengan menggunakan *RNeasy mini Kit* (Qiagen) sesuai dengan petunjuk penggunaan.

Sejumlah 100 iL *supernatant* dari contoh *swab*, dimasukkan ke dalam 600 iL *buffer-RLT* yang berisi 6 iL *β-mercaptoethanol*. Contoh dikocok dengan cara vorteks dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 5 menit, untuk selanjutnya ditambah 600 iL ethanol 70% lalu dikocok dengan vorteks. *Rneasy spin column* ditempatkan ke dalam tabung koleksi 2 mL. Sejumlah 700 iL contoh dimasukkan ke dalam *column* tersebut secara hati-hati kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 detik. *Spin column* dipindahkan ke tabung koleksi 2 mL baru, dan *buffer-RW1* sebanyak 700 iL ditambahkan ke *spin column*, disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 detik. *Spin column* dipindahkan ke tabung koleksi yang baru. Sebanyak 500 iL *washing buffer-RPE* ditambahkan, dan disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 detik. *Spin column* diambil dan cairan dari dasar tabung koleksi 2



Gambar 1. Hasil elektroforesis gel dari produk BaSS-PCR. M= Marker, 1=S19 (isolat vaksin), 2=S99, 3= CH-PR, 4= BM, 5= *Brucella* spesies, 6= Kontrol negatif, 7=YNT-KP, 8=DKI577, 9= *Brucella* spesies, 10= *Brucella* spesies, 11=CH07-BL, 12= CH04-BL, 13=CH06-BL, 14=CH09-BL, dan 15= S19 (vaksin)

mL dikosongkan. *Spin column* ditempatkan ke dalam tabung koleksi 2 mL dan sebanyak 500 μ L *washing buffer*-RPE ditambahkan ke dalam *spin column* dan disentrifus dengan kecepatan penuh (*full speed*) selama 2 menit. *Rneasy spin column* diletakkan ke tabung *microcentrifuge* 1,5 ml dan ditambahkan 50 μ L *RNase-free water* ke dalam *spin column* membrane, kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. RNA yang diperoleh kemudian diuji lanjut dengan menggunakan metode *Real time RT-PCR* untuk mengidentifikasi adanya virus nipah dalam spesimen. Semua pekerjaan dari preparasi contoh sampai isolasi RNA dilakukan didalam *Biosafety Cabinet* (BSC) class 2 A 2.

Real-Time Reverse Transcriptase-PCR (qRT-PCR). Identifikasi virus nipah dilakukan dengan *Real-time RT-PCR* menggunakan reagen *TaqMan One-step RT-PCR Master Mix*

Reagents (Invitrogen). Sekuen primer nipah yaitu nipah-N1198F (5'-TCA GCA GGA AGG CAA GAG AGT AA-3') dan nipah-N1297R (5'-CCC CTT CAT CGA TAT CTT GAT CA-3') serta Probe nipah-1247comp-FAM (5'-CCT CCA ATG AGC ACA CCT CCT GCA G-3') dan program *real time RT-PCR* yang digunakan sesuai dengan protokol *Australian Animal Health Laboratory* (AAHL), Geelong, Australia (2006). Contoh yang diuji, dihitung untuk menentukan jumlah reaksi yang diperlukan dalam satu *plate*. Dalam reaksi PCR disertakan kontrol positif (K+), kontrol negative (NTC) atau kontrol tanpa *template* RNA dan juga 18s RNA yang diperoleh dari AAHL. *Master mix* terdiri dari *TaqMan*® 2X Universal PCR master mix no AmpErase® UNG (*TaqMan*® one-step RT-PCR kit Applied Biosystems) 12,5 μ L; 40X Multiscribe dan *Rnase inhibitor mix* 0,625 μ L; *Primer probe* masing-

masing 1,25 μ L; 18s kontrol *primer probe* 0,375 μ L dan RNase free water 5,75 μ L. *Master mix* dialiquot 23 μ L ke dalam sumuran yang telah ditentukan pada ABI PRISM™ 96-well *optical*. Sebanyak 2 μ L viral RNA dimasukkan ke dalam sumuran uji secara hati-hati. Untuk kontrol tanpa *template* tidak dimasukkan RNA. *Plate* disegel dengan ABI PRISM™ *optical adhesive cover* dan disentrifuse sesaat untuk menurunkan semua reagen ke dasar sumuran.

Proses dilakukan dalam mesin 7300 *Real-time ThermoCycler (Applied Biosystem)* dengan kondisi reaksi yaitu 30 menit pada suhu 48°C (*reverse transcription*), 10 menit pada suhu 95°C (*hot-start Taq polymerase activation*), dan 45 siklus dari 15 detik pada suhu 95°C dan 1 menit pada suhu 60°C (*target amplification*). Analisis hasil menggunakan *software* yang tersedia dalam mesin. *Threshold (T)* dibuat pada rentang kurva linier yang diamplifikasi (0,05–0,10), yang digunakan untuk menentukan *Cycle Threshold (Ct)*. Hasil *Real time PCR* positif jika nilai Ct di bawah 37, hasil meragukan jika nilai Ct 37-40 dan hasil negatif jika nilai Ct di atas 40.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 24 *swab* saliva telah berhasil dikumpulkan dari kalong asal Medan, sedangkan contoh dari Kabupaten Deli Serdang, terkumpul, 47 contoh *swab* saliva (Tabel 1). Pada saat mengoleksi specimen *swab* saliva asal kalong, penggunaan alat pelindung diri (APD) wajib digunakan seperti masker, sarung tangan, dan jas lab untuk menghindari terjadinya infeksi dari kalong ke manusia. Selain itu risiko terhadap gigitan ektoparasit asal kalong yang mengandung agen patogen perlu menjadi bahan pertimbangan dalam menggunakan *insect repellent*.

Hasil pengukuran lengan kalong menunjukkan terdapat variasi panjang lengan kalong, mulai dari 17 *cm* hingga 21 *cm*. Umumnya kalong muda mempunyai panjang lengan antara 17 *cm* hingga 18,5 *cm*. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa semua kalong yang diperoleh di Provinsi Sumatera Utara adalah jenis *P. vampyrus* (Gambar 1).

Virus nipah dikategorikan dalam kelompok risiko 4. Virus nipah dapat menginfeksi

Tabel 1. Hasil pemeriksaan virologi terhadap virus nipah pada kalong *Pteropus vampyrus* dengan *Real Time-Polymerase Chain Reaction* dari dua lokasi di Provinsi Sumatera Utara .

No.	Lokasi	Jumlah contoh	+ (%) <i>real time PCR</i>
1	Medan Kota	20	0 (0%)
2	Kab. Deli Serdang	47	1 (2,1%)
3	Total	67	1 (1,4%)



Gambar 1. Pengukuran long arm kalong yang disampling

manusia dan hewan, dan menyebabkan penyakit yang serius bahkan dapat berakibat fatal. Virus menyebar dengan cepat dalam komunitas yang tertular dan belum ada pencegahan ataupun pengobatannya. Oleh karena itu, dalam melakukan kegiatan yang berhubungan dengan virus hidup seperti isolasi virus dan uji serum netralisasi, maka kegiatan tersebut harus dilakukan di laboratorium dengan tingkat keamanan BSL4.

Di Indonesia, laboratorium dengan fasilitas BSL4 belum tersedia. Keterbatasan ini menyebabkan penelitian yang menggunakan virus hidup, tidak dapat terlaksana, termasuk di antaranya melakukan isolasi virus. Uji *real time PCR* (qPCR), merupakan metode yang baik dan tepat untuk dapat diterapkan di negara yang tidak mempunyai laboratorium BSL4 dalam melakukan deteksi virus nipah. (Wacharapluesadee dan Hemachudha, 2007). Menurut Guillaume (2004), *TaqMan* RT-PCR dari *nucleoprotein* virus nipah telah dikembangkan untuk mendeteksi RNA virus nipah dari contoh lapang dengan cepat dan spesifik, dan umumnya *nucleoprotein* nipah termasuk gen yang *conserve* di antara virus nipah dan kerabat/*related* virus nipah. Uji ini telah terbukti sensitif, dapat dipercaya, cepat dan quantitative dalam mendeteksi contoh lapang, sehingga dapat dikembangkan sebagai uji untuk mendeteksi virus nipah, yang dapat dijadikan gambaran awal adanya kemungkinan RNA virus nipah. **Oleh karena itu**, uji *real time PCR* untuk mendeteksi virus nipah pada kalong telah diterapkan pada penelitian ini.

Penggunaan contoh *swab* saliva *P vampyrus*, sejalan dengan laporan Wacharapluesadee *et al.*, (2005; 2006) yang melaporkan bahwa virus nipah dapat terdeteksi dari urin, *swab* saliva, dan spesimen biologi

lainnya dari *Pteropus sp.* Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *swab* saliva tersebut dapat dijadikan alternatif terbaik dalam pengambilan contoh di lapang, karena hewan tidak dibunuh. Mengingat harga kalong di pasaran cukup mahal maka pengambilan contoh *swab* saliva atau urin merupakan contoh yang paling mungkin diperoleh dengan harga relatif lebih murah dibandingkan dengan membeli kalong tersebut. Namun demikian, pengambilan contoh saliva memerlukan penanganan kalong yang benar, agar petugas yang mengambil *swab* saliva tidak tergigit (terkontaminasi).

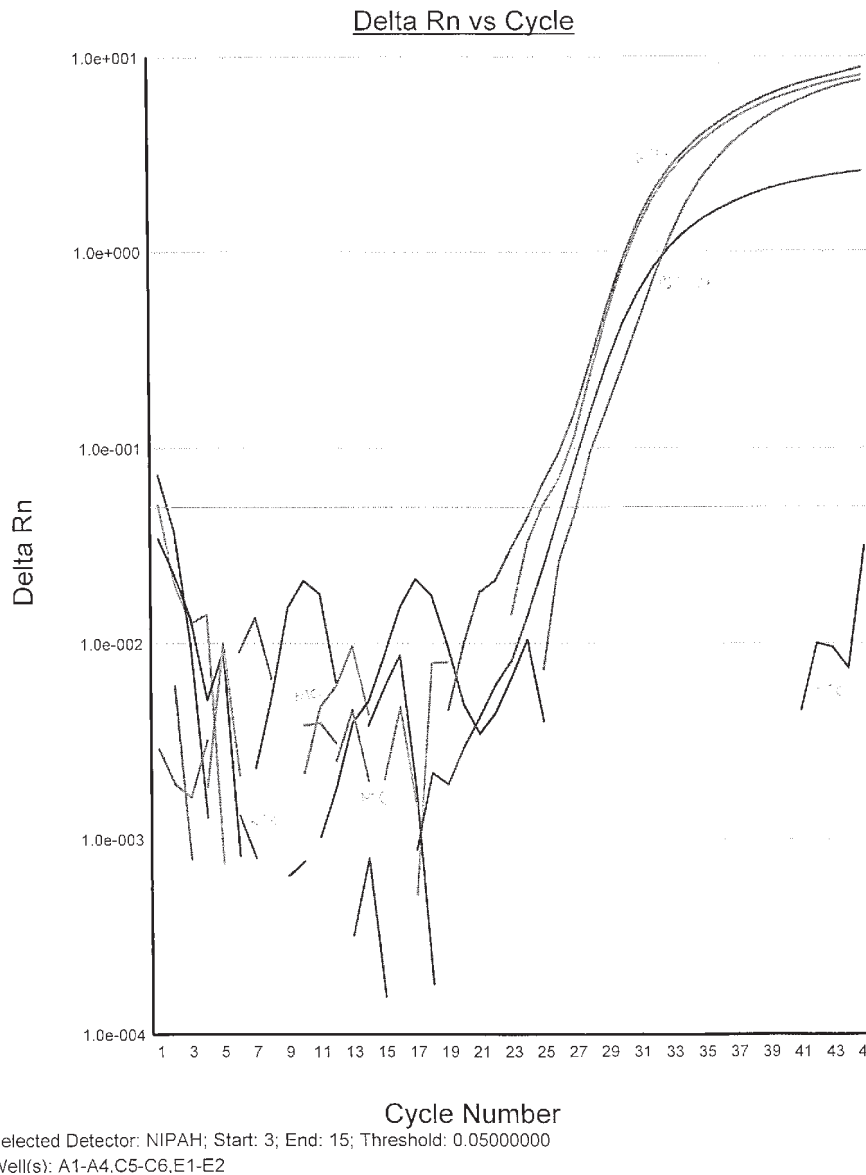
Dibandingkan dengan pengambilan contoh organ, seperti kantung kemih, maka pengambilan contoh saliva relatif murah, karena dengan pengambilan organ kalong tersebut harus dibunuh. Pembunuhan ini tentunya memerlukan berbagai prosedur penanganan hewan dan etika serta ijin pengambilan contoh dari institusi yang berwenang. Cara seperti ini dapat dipastikan membutuhkan biaya penelitian yang lebih besar dibandingkan dengan pengambilan contoh urin dan saliva.

Hasil uji *real time PCR* sebagai uji saringan terhadap kemungkinan adanya virus nipah pada contoh kalong yang diperiksa, menunjukkan bahwa satu contoh *swab* saliva (DSK 21) dari 47 contoh *swab* saliva yang berasal dari Kabupaten Deli Serdang memberikan reaksi positif pada uji *real time PCR* seperti Tabel 1. Contoh saliva tersebut mempunyai *Ct value* di bawah 37 (Gambar 2). Kontrol positif Nipah (K+) juga mempunyai *Ct value* di bawah 37. Contoh yang positif *real time PCR* dikonfirmasi oleh *Australian Animal Health Laboratory*, Geelong, Australia. Hasil konfirmasi menunjukkan bahwa contoh tersebut positif virus nipah (Tabel 2)

Tabel 2. Hasil uji *Real time PCR* dan konfirmasi *Pteropus vampyrus* terhadap infeksi virus nipah di Propinsi Sumatera Utara.

No.	Kode Contoh	Jenis Contoh	<i>Real time PCR</i>	Konfirmasi AAHL	Kesimpulan
1.	DSK 21	<i>swab</i> Saliva	+	+	Contoh mengandung virus nipah/ hendra
2	Kontrol +		+	+	Contoh mengandung virus nipah
3	Kontrol -		-	-	Contoh tidak mengandung virus nipah

Keterangan : PCR : *Polymerase Chain Reaction*; AAHL: *Australian Animal Health Laboratory*.



Gambar 2. Hasil uji *real time PCR* pada contoh *swab* saliva *P. vampyrus*

Dari hasil pengujian diperoleh bahwa hasil positif dari contoh *swab* saliva yang berasal dari kalong No DSK21, membuktikan bahwa kalong tersebut mengandung virus nipah. Hasil ini juga membuktikan bahwa virus nipah diekskresikan melalui saliva, dan hasil ini sejalan dengan yang dilaporkan Wacharapluesadee *et al.*, (2005; 2006), yang menyatakan bahwa kalong *Pteropus* mengekskresikan virus nipah melalui urin, saliva dan oagan lainnya termasuk kantung kemih / *vesica urinaria*. Sedikitnya virus nipah yang terdeteksi dengan uji *real time PCR*, pada penelitian ini mungkin disebabkan karena waktu yang kurang tepat dalam mengkoleksi

contoh kalong, sehingga ekskresi virus nipah belum dapat terdeteksi saat pengambilan contoh.

Middleton *et al.*, (2007) juga mengemukakan bahwa isolat virus tidak berhasil diperoleh dari kantung kemih 22 hari pasca-inokulasi. Faktor-faktor tersebut juga memengaruhi keberhasilan isolasi virus nipah pada *Pteropus sp.* di lapang. Hal ini terlihat dari 67 ekor *P. vampyrus*, hanya satu isolat yang berhasil terdeteksi yaitu dari dari kalong No. 21. Pada kalong tersebut virus nipah dapat terdeteksi dari *swab* saliva. Kemungkinan lain penyebab rendahnya tingkat keberhasilan dalam kegiatan ini adalah isolasi virus lebih sulit

dilakukan baik dari *swab* saliva, urin, maupun organ. Hal ini disebabkan karena masa hidup virus nipah pada urin dan saliva yang dieksresikan sangat terbatas. Fogarty *et al.*, (2008) melaporkan, bahwa virus nipah yang diinkubasikan pada urin *P.vampyrus* (pH 2) dengan suhu 22°C dan 37°C dapat bertahan hingga 30 menit, dan bila diinkubasikan pada urin yang memiliki pH 7, dapat bertahan 18 jam pada suhu 22°C dan 2 jam pada suhu 37°C. Hal ini sangatlah penting dalam hal transportasi contoh urin ke laboratorium bila akan melakukan isolasi virus nipah. Singkatnya waktu hidup virus nipah, disebabkan virus nipah sensitif terhadap pH media, sehingga menyebabkan kegagalan dalam melakukan isolasi virus dari lapang. Oleh karena itu bila ingin melakukan isolasi virus, maka perlu manajemen yang baik sehingga contoh lapang dapat tiba di laboratorium dalam kurun waktu yang sesingkat mungkin. Kondisi yang demikian menyebabkan deteksi virus nipah di berbagai negara lebih sering dilakukan dari *reservoir host*, dibandingkan dengan melakukan isolasi virus.

Uji PCR tidak menjamin bahwa virus nipah dapat terdeteksi, karena reaksi silang dapat terjadi dengan virus Hendra, namun demikian konfirmasi dengan *sequencing*, yang dilakukan di laboratorium referensi virus nipah seperti *Australian Animal Health Laboratory* (AAHL), menunjukkan bahwa saliva yang berasal dari kalong No. DSK 21 mengandung virus nipah (Tabel 2). Terdeteksinya virus nipah pada kalong tersebut, mengindikasikan kemungkinan terjadinya penyakit *emerging* dapat terjadi, meskipun terjadinya wabah penyakit *emerging* dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya faktor virus, manusia, dan ekologi (Ka *et al.*, 2006).

SIMPULAN

Uji *real time PCR* dapat diterapkan sebagai alternatif terbaik dalam melakukan uji saringan untuk mendeteksi virus nipah dari contoh asal lapang, terutama di negara yang tidak mempunyai laboratorium BSL4. Hasil uji *real time PCR* ini dapat dipergunakan sebagai indikator awal keberadaan virus nipah.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih yang sebesar-besarnya penulis tujukan untuk staf dan teknisi di Bagian Virologi Bbalitvet, Dinas Peternakan Propinsi Sumatera Utara, BPPV Medan, staff perpustakaan Bbalitvet, dan Direktorat Jendral Peternakan-Jakarta yang telah banyak membantu dalam proses kegiatan penelitian ini. Kepada Sdr Heri Nasution, yang telah banyak membantu pekerjaan di lapang, penulis ucapkan terimakasih.

DAFTAR PUSTAKA

- Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. 2005. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev* 22 : 531–45.
- Chadha MS, Comer JA, Lowe L, Rota PA, Rollin PE, Bellini WJ, Ksiazek TG, Mishra AC. 2006. Nipah virus-associated encephalitis outbreak, Siliguri, India. *Emerg Infect Dis* 12 : 235–240.
- Chua KB, Koh CL, Hooi PS, Wee KF, Khong JH, Chua BH. 2002. Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes. *Microbes Infect* 4 :145–51.
- Chua KB, Bellini WJ, Rota PA, Harcourt BH, Lam SSK, Ksiazek TG, Rollin PE, Zaki SR, Shieh WJ, Goldsmith CS, Gubler DJ, Roehrig JT, Eaton BT, Gould A, Olson J, Field H, Daniels P, Ling AE, Peters CJ, Anderson LJ, Mahy WJ. 2000. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288 : 1432–1435.
- Daniels P, Ksiazek T, Eaton BT. 2001. Laboratory diagnosis of Nipah and Hendra infections. *Microbes Infect* 3 : 289-295.
- Diederich S, Maisner A. 2007. Molecular characteristics of the Nipah virus glycoproteins. *Ann N Y Acad Sci* 1102 : 39-50.
- Fogarty R, Halpin K, Hyatt AD, Daszak P, Mungall BA. 2008. Henipavirus susceptibility to environmental variables. *Virus Research* 132 : 140–144
- Guillaume V A, Lefeuvre A, Faure C, Marianneau P, Buckland R, Lam SK, Wild TF, Deubel V. 2004. Specific detection of

- Nipah virus using real-time RT-PCR (TaqMan). *J Virol Methods* 120 (2) : 229-237.
- Hsu VP, Hossain MJ, Parashar UD, Ali MM, Ksiazek TG, Kuzmin I, Niezgodna M, Rupprecht C, Bresee J, Breiman RF. 2004. Nipah virus encephalitis reemergence, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 10 : 2082-2087.
- Johara MY, Field H, Rashdi AM, Morrissy C, van der Heide B, bin Adzhar A, White J, Daniels P, Jamaluddin A, Ksiazek T. 2001. Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. *Emerg Infect Dis* 7 : 439-441.
- Ka WH E. 2006. Reasons for the increase in emerging and re-emerging viral infectious diseases. *Microbes and Infection* 8 : 905-916.
- Li Y, Jianmin W, Andrew C, Hickey C, Zhang Y, Li Y, Wu Y, Zhang H, Yuan Y, Han Z, McEachern J, Christopher C, Broder C, Wang LF, Shi Z. 2008. Antibodies to Nipah or Nipah-like Viruses in Bats, China. *Emerg Infect Dis* 14 : 1974-1976.
- Lo MK, Rota PA. 2008. The emergence of Nipah virus, a highly pathogenic paramyxovirus. *J Clin. Virology* 43 : 396-400.
- Luby SP, Rahman M, Hossain MJ, Blum LS, Husain MM, Gurley E, Khan R, Ahmed B, Rahman BN, Nahar S, Kenah N, Comer E JA, Ksiazek TG. 2006. Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 12 : 1888-1894.
- Middleton DJ, Morrissy CJ, van der Heide BM, Russell GM, Braun MA, Westbury HA, Halpin K, Daniels PW. 2007. Experimental Nipah Virus infection in Pteropid Bats (*Pteropus poliocephalus*). *J Comp Pathol* 136 : 266-272.
- Olson JG, Rupprecht C, Rollin PE, An US, Niezgodna M, Clemins T, Walston J, Ksiazek TG. 2002. Antibodies to Nipah-like virus in bats (*Pteropus lylei*), Cambodia. *Emerg Infect Dis* 8 : 987-988.
- Reynes JM, Counor D, Ong S, Faure C, Seng V, Molia S, Walston J, Georges-Courbot MC, Deubel V, Sarthou JL. 2005. Nipah virus in lyle's flying foxes, Cambodia. *Emerg Infect Dis* 7 : 1042-1047.
- Sendow I, Field HE, Curran J, Darminto, Morrissy C, Greer M, Buick T, Daniels P. 2006. Nipah virus in *Pteropus vampyrus* bats, Indonesia. *Emerg Infect Dis* 12 : 711-712.
- Sendow I, Field H, Abdul Adjid RM, Syafriati T, Darminto, Morrissy C, Daniels P. 2008. Seroepidemiologi Nipah virus pada kalong dan ternak babi di beberapa wilayah di Indonesia. *J Biol Indonesia* 5: 35-44.
- Wacharapluesadee S, and T. Hemachudha. 2007. Duplex nested RT-PCR for detection of Nipah virus RNA from urine specimens of bats. *J Virol Methods* 141 : 97-101.
- Wacharapluesadee S, Boongird K, Wanghongsa S, Phumesin P, Hemachudha T. 2006. Drinking bat blood may be hazardous to your health. *Clin Infect Dis* 43 : 269.
- Wacharapluesadee S, Lumlertdacha B, Boongird K, Wanghongsa S, Chanhom K, Rollin P, Stockton P, Rupprecht CE, Ksiazek TG, Hemachudha T. 2005. Bat Nipah virus, Thailand. *Emerg Infect Dis* 11 : 1949-1951.
- Wild T F. 2008. Henipaviruses: A new family of emerging Paramyxoviruses, *Pathologie Biologie* doi:10.1016/j.patbio.2008.04.006 Tanggal 10 Mei 2009