

Deteksi Virus Rabies pada Kasus *Ante-Mortem* dengan RT-PCR

Agustiningsih, Kartika Dewi Puspa, Arie Ardiansyah Nugraha, Vivi Setiawaty
Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Balitbangkes, Kemenkes RI
email: vilitbang@yahoo.com

Abstract

Rabies virus detection using Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT – PCR) was considered to have high sensitivity and specificity. This method is relatively faster and easy to perform in comparison with other methods such as Fluorescent Antibody Test (FAT) and Mouse Inoculation Test (MIT). Therefore, the RT PCR method is used as ante mortem diagnosis of rabies. A total of 74 specimens such as saliva, conjunctival swabs and under tongue swabs were collected from the bites of animal transmitting rabies cases. The 74 specimens were collected from 28 human cases of suspected rabies outbreaks in 2009-2013 that has been tested in the Virology Laboratory, Center for Biomedical and Basic Technology of Health. All specimens examined by RT - PCR method using two primer pairs that amplify the partial gene regions of the N and G genes of the rabies virus. Two of the 74 specimens gave positive results of rabies by RT - PCR, i.e saliva and under-tongue swab from human cases of animal bites in 2009. RT-PCR assay can be used for ante mortem diagnosis of the rabies virus. The laboratory results are influenced by the type of specimen and collection time.

Key words : Rabies, Outbreak, RT-PCR

Abstrak

Deteksi virus rabies menggunakan metode *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dinilai memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. Kemudahan pengerjaan dan hasil pemeriksaan yang relatif cepat dibandingkan dengan metode *Fluorescent Antibody Test* (FAT) dan *Mouse Inoculation Test* (MIT) yang merupakan metode standar WHO yang menjadikan RT-PCR lebih banyak digunakan untuk deteksi ante mortem virus rabies. Sebanyak 74 spesimen kasus gigitan hewan penular rabies (GHPR) yaitu saliva, apus selaput mata dan apus bawah lidah yang berasal dari 28 kasus tersangka rabies pada kejadian luar biasa pada tahun 2009-2013 yang telah diperiksa oleh laboratorium Virologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan. Seluruh spesimen diperiksa dengan metode RT-PCR menggunakan 2 pasang primer yaitu primer yang mengamplifikasi sebagian region pada gen N dan gen G dari virus rabies tersebut. Dua dari 74 spesimen memberikan hasil positif rabies berdasarkan hasil pemeriksaan dengan RT-PCR, yaitu spesimen saliva dan swab bawah lidah dari kasus gigitan anjing pada tahun 2009. Pemeriksaan ante mortem terhadap virus rabies dapat menggunakan metode RT-PCR dengan memperhatikan waktu pengambilan dan jenis spesimen.

Kata Kunci : Rabies, KLB, RT-PCR

Pendahuluan

Rabies atau dikenal dengan penyakit anjing gila merupakan penyakit zoonosis yang disebabkan oleh Lyssa-virus yang termasuk ke dalam *family Rhabdoviridae*. Virus rabies bertransmisi melalui luka atau kontak langsung dengan permukaan mukosa dari hewan penular rabies. Beberapa hewan yang secara umum dapat menularkan rabies diantaranya anjing, kucing, kerbau, rakun, sigung, kelelawar, dan rubah. Sapi, kerbau, kambing, kuda juga dapat menderita rabies, bila digigit oleh hewan yang terinfeksi rabies.^{1,2,3} Virus rabies menyerang otak dan sistem saraf pusat dengan gejala awal seperti flu, demam, sakit kepala tetapi progres infeksi bisa secara cepat menjadi halusinasi, paralisis dan berakhir dengan kematian.^{2,4}

Sampai saat ini infeksi rabies masih menjadi masalah kesehatan di Indonesia. Kasus rabies dari berbagai wilayah Indonesia masih dilaporkan dari tahun ke tahun. Dalam waktu 10 tahun sejak tahun 1996-2006 jumlah kematian akibat rabies berkisar antara 0,5 – 1% kasus. Saat ini penyakit rabies telah tersebar di 24 provinsi dengan jumlah kasus gigitan hewan penular rabies dan kasus kematian karena rabies yang tinggi mencapai 100% di Indonesia.⁵ Jumlah kematian akibat rabies pada tahun 2011 sebanyak 2 orang dari 546 kasus gigitan hewan penular rabies. Pada tahun 2012, tidak ada laporan kematian pada 138 kasus gigitan hewan penular rabies. Namun pada tahun 2013, 15 dari 16.258 kasus gigitan hewan penular rabies meninggal.⁶

Merebaknya kasus rabies di provinsi Bali yang sebelumnya merupakan provinsi yang dinyatakan bebas rabies menyebabkan perlunya penanggulangan rabies antara lain dengan vaksinasi dan eliminasi terhadap hewan penular rabies.⁷ Terdapat sembilan provinsi yang masih dinyatakan bebas rabies, yaitu Nusa Tenggara Barat, Papua, Papua Barat, Bangka Belitung, Kepulauan Riau, DKI

Jakarta, DIY, Jawa Tengah dan Jawa Timur.⁵

Deteksi virus rabies di laboratorium dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain: a) mikroskopis, untuk melihat dan menemukan Negris Bodies (pewarnaan Seller, *Fluorescent Antibody Test* (FAT) dan hispatologik); b) antigen-antibodi, berdasarkan reaksi dengan uji virus netralisasi, gel agar presipitasi atau reaksi pengikatan komplemen dan FAT; c) isolasi virus, yang dilakukan pada mencit, *Mouse Inoculation Test* (MIT) atau invitro pada biakan jaringan diikuti identifikasi isolat dengan cara pewarnaan FAT atau uji virus netralisasi.⁵

Diagnosis rabies pada manusia dapat dilakukan menggunakan spesimen jaringan otak atau cairan otak dengan metode FAT karena lebih sensitif dan spesifik mendeteksi virus rabies namun tidak dapat digunakan untuk mendeteksi virus rabies pada saat ante mortem.⁸ Deteksi virus rabies menggunakan metode RT-PCR dinilai memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi untuk pemeriksaan ante-mortem.^{9,1} RT-PCR merupakan metode yang mudah dilakukan dengan waktu pengerjaan yang lebih cepat dibandingkan dengan FAT dan MIT. Hal ini merupakan kelebihan metode RT-PCR dibandingkan metode pemeriksaan lainnya sehingga deteksi virus rabies pada kasus manusia tersangka tertular rabies melalui gigitan hewan penular rabies (GHPR) dapat dilakukan lebih cepat. Penelitian ini bertujuan untuk menggambarkan penggunaan RT-PCR untuk deteksi virus rabies pada kasus tersangka rabies yang ditularkan melalui gigitan hewan penular rabies.

Metode

Sampel Klinis

Sampel merupakan seluruh spesimen kasus KLB GHPR pada manusia yang diterima oleh Laboratorium Virologi Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

tahun 2009-2013, yang berupa saliva, apus selaput mata dan apus bawah lidah dari kasus tersangka rabies.

Pemeriksaan RT-PCR

Isolasi RNA dilakukan dengan menggunakan kit komersial dan sesuai dengan protokol kit (Qiagen, Hilden Jerman). Pemeriksaan spesimen rabies dilakukan dengan menggunakan metode RT-PCR, yaitu dengan mengamplifikasi gen N dan gen G sebagai target amplifikasi. Terdapat dua 2 pasang primer yang digunakan dalam pemeriksaan ini (Tabel 1). Set pertama didesain dari nukleoprotein gen N dengan panjang produk amplifikasi 262 bp, sedangkan set kedua didesain dari glicoprotein gen N dengan panjang produk amplifikasi 210 bp.

Reverse transkripsi dan amplifikasi dilakukan dengan menggunakan *SuperscriptTM One Step RT-PCR with Platinum Taq* (Invitrogen, Carlsbad, CA) dengan volume total reaksi sebanyak 25 μ L. Setiap reaksi RT-PCR mengandung 1x PCR Buffer, 200 μ L dNTPs, 1.6mM $MgSO_4$, 0.2 μ M pirmer *forward* dan

reverse, 1 μ L Superscript III RT dan Platinum Taq mix serta 5 uL template RNA hasil ekstraksi RT-PCR dilakukan dengan tahapan sebagai berikut: reverse transkripsi pada suhu 55⁰C selama 30 menit, *hot start* pada suhu 94⁰C selama 2 menit dan 40 siklus PCR yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94⁰C selama 30 detik, primer *annealing* pada suhu 50⁰C selama 30 detik dan *extension* pada suhu 72⁰C selama 1 menit.¹⁰

Produk hasil PCR dianalisa dengan elektroforesis menggunakan *gel agarose 2%* yang mengandung *ethidium bromida*, dengan tegangan 100 volt selama 45 menit. Gel elektroforesis divisualisasikan menggunakan *gel documentation* dibawah sinar UV. Panjang produk amplifikasi spesimen dibandingkan dengan kontrol positif dan DNA ladder. Pada pemeriksaan RT-PCR ini digunakan vaksin VERORAB sebagai kontrol positif.

Tabel 1. Primer yang Digunakan pada RT-PCR Sampel Rabies

Primer	Sekuens	Posisi
gen N		
RN 4	5'-GAG TCA CTC GAA TAT GTC	1402-1419
RN 5	5'-GAG AAA GAA CTT CAA GA	1157-1173
gen G		
RG 3	5'-CCT GCA GAG CTT GCG GAT TTG TTG ACG	3981-4008
RG A	5'-CAA CAA GGT GCT CAA TTT CGT CTG AGC GAA	4162-4191

Hasil

Laboratorium Virologi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan menerima sebanyak 28 kasus tersangka GHPR pada tahun 2009 hingga 2013 dengan 74 sampel berupa saliva, apus selaput mata dan apus bawah lidah. Rentang usia kasus tersangka rabies adalah

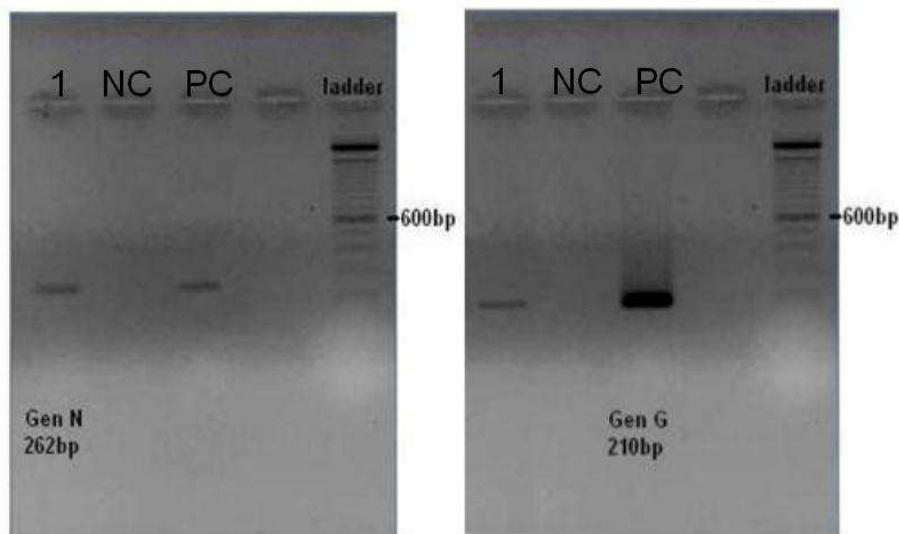
antara 2,5 hingga 78 tahun. 10 kasus diantaranya (33%) merupakan anak-anak. Hanya sedikit data yang menyatakan adanya riwayat GHPR 2 bulan sebelum munculnya gejala klinis rabies dikarenakan data epidemiologi pada kuisioner yang tidak lengkap. Jumlah kasus dan spesimen yang diterima setiap tahunnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Jumlah Kasus dan Spesimen Rabies per Tahun

Tahun	Jumlah Kasus	Jumlah Spesimen
2009	1	3
2010	6	12
2011	8	10
2012	11	34
2013	2	15

Sebanyak 74 spesimen yang berupa saliva, apus selaput mata dan apus bawah lidah dari kasus tersangka rabies dilakukan pemeriksaan RT-PCR terhadap gen G dan Gen N. Terdapat satu kasus positif terhadap virus rabies pada spesimen klinis berupa air liur dan swab bawah lidah yang diterima pada tahun 2009 (Gambar 1).

Tidak ada data mengenai pemberian vaksin rabies pada pasien tersangka rabies pada penanganan pasien pasca digigit oleh hewan penular virus rabies. Sebanyak 72 spesimen dari 27 kasus orang dengan gigitan hewan ini tidak memberikan hasil positif pada RT-PCR.



Gambar 1. Hasil Pemeriksaan Virus Rabies dengan RT-PCR.

Gambar 1a merupakan gen N, dan 1b merupakan gen G. No. 1 merupakan sampel, NC adalah kontrol negatif, PC adalah kontrol positif.

Pada kasus GHPR ini, terdapat 2 spesimen yang berasal dari satu kasus GHPR dengan hasil positif terhadap gen N dan gen G virus rabies. Kasus gigitan berasal dari Lampung dan dirawat di RS Sulianti Saroso dengan gejala terinfeksi virus rabies. Sampel tersebut berupa air liur dan swab bawah lidah akan tetapi data epidemiologi mengenai tanggal onset ataupun riwayat gigitan tidak tersedia sehingga analisis mengenai hubungan jenis sampel dengan tanggal onset tidak dapat dilakukan.

Pembahasan

Rabies merupakan masalah kesehatan di Indonesia dengan tingkat kematian yang tinggi. Rabies didiagnosis berdasarkan gejala klinis spesifik berupa *hydrophobia* dan *aerophobia*. Pada umumnya pasien dengan gejala tersebut mengalami kematian sehingga pemeriksaan dan konfirmasi laboratorium terhadap rabies pada tahap awal penyakit sangat dianjurkan.

Pemeriksaan standar untuk rabies menurut WHO adalah dengan menggunakan metode FAT dan MIT. FAT digunakan sebagai tes pendahuluan dan diikuti dengan tes konfirmasi pada *Rabies Tissue Culture Infection Test* (RTCIT) atau MIT. Akan tetapi FAT dan RTICT ataupun MIT tidak dapat dilakukan pada spesimen air liur untuk mendeteksi virus rabies pada kasus tersangka rabies dan menegaskan diagnosis rabies pada saat ante mortem. Beberapa tes seperti pemeriksaan hapus korneal (*corneal smear*) dan *frozen section skin biopsy* telah diketahui dapat digunakan untuk diagnosis *ante mortem* rabies walaupun kurang sensitif.^{2, 8, 11}

Diagnosis *ante mortem* rabies menggunakan RT-PCR merupakan salah satu metode yang saat ini digunakan. Penelitian-penelitian sebelumnya oleh

Crepin et al dan Nagaraj et al melaporkan bahwa konvensional RT-PCR merupakan metode yang dapat diandalkan untuk diagnosis ante mortem rabies dengan menggunakan spesimen air liur.^{8, 12} Pemeriksaan RT-PCR merupakan metode yang dapat dipercaya dan sensitif untuk digunakan pada diagnosis ante mortem rabies dengan menggunakan saliva bila sampel yang digunakan diperoleh pada saat yang tepat

Jenis sampel yang digunakan serta suhu pada saat pengiriman sampel sangat mempengaruhi hasil pemeriksaan *ante mortem* rabies. Spesimen yang dapat digunakan antara lain saliva, cairan otak, biopsi kulit yang mengandung folikel rambut (diambil pada leher) dan urin.¹³ Virus tidak selalu dapat ditemukan pada saliva dan cairan otak sehingga pemeriksaan harus dilakukan secara serial selama 3 hari.⁸ Pengiriman spesimen ke laboratorium sangat dianjurkan pada suhu 2-8°C untuk menjaga kualitas sampel dan menghindari hasil negatif palsu yang mungkin disebabkan karena kerusakan sampel.^{12, 13}

Pemeriksaan *ante mortem* rabies dengan RT-PCR menggunakan gen N dan G sebagai target amplifikasi. Gen N merupakan gen yang lestari pada genom virus rabies dan ditranslasikan dalam jumlah yang besar pada saat virus bermultiplikasi. Sedangkan Gen G merupakan gen penyandi protein G pada envelop virion yang digunakan untuk studi epidemiologi dan typing.¹⁴ Keterbatasan pada penelitian ini adalah tidak tersedianya data pendukung seperti jenis kelamin, tanggal onset, riwayat *post exposure prophylaxis*, dan data klinis. Hal ini menyebabkan studi epidemiologi tidak dapat dilakukan.

Kesimpulan

RT-PCR dapat digunakan untuk mendeteksi virus rabies pada spesimen kasus *ante mortem* manusia dengan memperhatikan waktu pengambilan dan jenis spesimen.

Saran

Pentingnya data pendukung yang lengkap agar surveilans epidemiologi dapat terlaksana dengan baik dan teratur. Pengambilan spesimen *ante mortem* hendaknya memperhatikan waktu pengambilan dan jenis spesimen yang diambil.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Drh. I Gusti Ngurah Mahardika dari Universitas Udayana, Bali yang telah menyediakan sekuens primer yang digunakan pada pemeriksaan RT-PCR virus rabies. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada seluruh tim laboratorium virologi yang telah melakukan pemeriksaan terhadap spesimen kasus tersangka gigitan hewan penular rabies dan mengarsipkan hasil-hasil pemeriksaan dengan baik.

Daftar Rujukan

1. WHO. About Rabies. Tersedia di: <http://www.who.int/rabies/about/en/>. Diunduh tanggal 21 Januari 2014.
2. Yousaf MZ, Qasim M, Zia S, Khan M, Ashfaq UA, Khan S. *Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment*. Virol J;2012;9:50.
3. Niezgod, Michael; Catleen A. Hanlon and Charles E. Rupprecht. Animal Rabies. *Rabies* (Ed. Jackson, C.A., and Wunner, W.H). 2002. Academic Press. p 163-218.
4. Jackson, Alan C. Human Disease. *Rabies* (Ed. Jackson, C.A., and Wunner, W.H). 2002. Academic Press. p 219-245.
5. Direktorat Jenderal Pencegahan Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. Pedoman Pelaksanaan Program Penanggulangan Rabies di Indonesia. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2011.
6. Jumlah kasus Gigitan. 2013. Info penyakit. Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Kementerian Kesehatan RI. Tersedia di http://www.infopenyakit.org/search_info.asp. Diunduh pada tanggal 8 Maret 2014
7. Susilawathi NM, Darwinata AE, Dwija IBNP, Budayanti NS, Wirasandi GAK, Subrata K, et al. *Epidemiological and clinical features of human rabies cases in Bali 2008-2010*. BMC Infect Dis; 2012;12:81.
8. Nagaraj T Vasanth JP, Desai A, Kamat A, Madhusudana SN, Ravi V. *Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques*. J Clin Virol.2006;36(1);17-23.
9. Biswal M, Ratho RK and Mishra B. *Usefulness of Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for Detection of Rabies RNA in Archival Samples*. Jpn. J. Infect. Dis.2007;60:298-299.
10. Biswal M, Ratho RK and Mishra B. *Role of RT PCR for the diagnosis of human rabies*. Indian J Med Res.2012;135:837-842.
11. WHO. Rabies, General Aspect & Laboratory Diagnosis Techniques. 2007. New Delhi: WHO Collaborating Centre for Rabies.
12. Crepin P, Audry L, Rotivel Y, Gacoin A, Caroff C, Bourhy H. *Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid*. J Clin Microbiol.1998;36(4):1117-21.
13. Dacheux L, Wacharapluesadee S, Hemachudha T, Meslin FX, Buchy P, Reynes J., et al. *More accurate insight into the incidence of human rabies in developing countries through validated laboratory techniques*. PLoS Negl Trop Dis.2010;4(11):e765.
14. Madhusudana SN and Sukumaran SM, *Antemortem diagnosis and prevention of human rabies*. Ann Indian Acad Neurol.2008;11(1):3-12.

