

ABSTRAK

ANALISIS GENETIK STRUKTURAL PROTEIN E2 VIRUS DIARE BOVINE YANG DIISOLASI DARI SAPI PERUSAHAAN YANG TERINFEKSI SECARA PERSISTEN DI YOGYAKARTA, INDONESIA

SAMI ULLAH KHAN

21/487183/SKH/00133

Diare virus sapi (BVD), suatu virus asam ribonukleat (RNA) yang sangat patogen, menyebabkan kerugian finansial dan kematian reproduksi yang sangat besar pada sapi perah di Yogyakarta dan secara global. Penelitian ini menggunakan analisis genetik untuk mengidentifikasi mutasi titik dalam protein struktural E2 dari isolat virus BVD (BVDV) yang didapat. Periode penelitian menunjukkan kami melakukan penelitian pada tahun 2023.

Kami mengumpulkan 118 sampel serum dari tahun 2019 hingga 2023, di antaranya hanya digunakan 10 sampel BVDV positif dan 108 sampel negatif yang kekurangan antigen BVDV. Protein berlapis antibodi monoklonal anti-Erns digunakan dalam uji immunosorben terkait-enzim penangkapan antigen tidak langsung (I-ACE) untuk mendeteksi antigen BVD yang ada dalam spesimen serum BVDV positif. Setelah dilakukan elektroforesis gel setelah RT-PCR, sepuluh sampel serum menunjukkan gen 5'UTR positif dengan ukuran pita 288 bp, yang menunjukkan adanya infeksi persisten BVDV di dalam tubuh sapi perah. Pada langkah awal reaksi berantai polimerase transkripsi balik dua langkah (2 langkah-RT PCR), enzim (superskrip III reverse transkriptase) dan primer (hexamer acak) digunakan untuk mengubah RNA BVDV menjadi asam deoksiribonukleat komplementer. (cDNA) selama proses transkripsi terbalik. Langkah terakhir melibatkan amplifikasi gen E2 dari cDNA BVDV yang dihasilkan melalui primer spesifik gen (E2_fwd: 5'-TGGTGGCCTTATGAGAC-3' dan P7_rev: 5'-CCCATCATCACTATTTCCACC-3') dan enzim (platinum taq DNA polimerase kesetiaan tinggi). Untuk melakukan pengurutan Sanger, 3 isolat positif BVDV-1 tersebut (sekitar 2,6% dari seluruh isolat) dipilih sebagai spesimen tipikal untuk setiap lokasi dan tahun antara 2019 dan 2023 menggunakan perhitungan proporsional.

Oleh karena itu, hanya dua isolat BVDV dengan genom lengkap yang dipilih untuk melakukan analisis homologis dan genetik berdasarkan gen E2 yang menggunakan Blast dan MEGA Versi 11 selain program Bioedit 7.2.5. Dengan menerapkan analisis filogenetik yang mengandalkan gen E2, sejumlah 1011 nukleotida isolat BVDV-1 yang berasal dari masing-masing dua isolat BVDV-1 Indonesia (n = 2) dan 23 strain referensi BVDV diperoleh dari Pusat Nasional. untuk database Informasi Bioteknologi (NCBI) dianalisis secara genetik bersama melalui MEGA-11 di dalam pohon filogenetik. Hasil analisis genetik pada pohon filogenetik menunjukkan bahwa kedua isolat BVDV Indonesia dikelompokkan ke dalam subgenotipe BVDV-1a, sedangkan strain BVDV acuan dikelompokkan ke dalam lima subgenotipe BVDV, yaitu BVDV-1a (n = 6), BVDV-1b (n = 3), BVDV-1c (n = 11), BVDV-1m (n = 1), dan BVDV-1n (n = 2). Cabang tersebut terdapat pada pohon filogenetik yang terletak sebelum pembagian kedua isolat BVDV kami dibagi menjadi dua cabang dengan nilai bootstrap maksimum yang sama yaitu 99%, yang menunjukkan tingkat kepercayaan yang tinggi.



Selanjutnya, kami mengamati cabang di dekat sampel penelitian kami, yang menampilkan nilai bootstrap 100, yang menunjukkan bahwa isolat 02 kami identik. Pada kedua isolat tersebut, V11 BVDV1/Indonesia/Yogyakarta/2023 dan V16 BVDV1/Indonesia/Yogyakarta/2023 dengan nomor akses GenBank masing-masing PP836388 dan PP836389, residu D7E yang dilestarikan termutasi serta sistein diubah/diubah menjadi serin (S) teridentifikasi pada posisi asam amino 201. Kami mengidentifikasi dua isolat BVDV yang termasuk dalam subgenotipe BVDV-1a. Temuan kami menunjukkan bahwa residu D7E yang dilestarikan dari isolat V11 BVDV1/Indonesia/Yogyakarta/2023 dan V16 BVDV1/Indonesia/Yogyakarta/2023 telah diubah. Isolat BVDV Indonesia mengalami mutasi sistein menjadi serin pada posisi asam amino 201 sehingga menyebabkan kegagalan vaksinasi, jangkauan inang hewan akan meningkat, dan alat diagnostik tidak efektif.

Kata kunci : virus diare virus sapi, mutasi sistein, protein E2, serin, virus diare virus sapi V11, virus diare virus sapi V161.

ABSTRACT

GENETIC ANALYSES OF THE STRUCTURAL PROTEIN E2 *BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS* ISOLATED FROM PERSISTENTLY INFECTED DAIRY CATTLE IN YOGYAKARTA, INDONESIA

SAMI ULLAH KHAN
21/487183/SKH/00133

Bovine viral diarrhea (BVD), a highly pathogenic ribonucleic acid (RNA) virus, causes devastating financial losses and reproductive deaths among dairy cattle in Yogyakarta and globally. This study used genetic analysis to identify point mutations within the E2 structural protein of the acquired BVD virus (BVDV) isolates. The study period shows that we performed the research in 2023.

We collected 118 serum samples from 2019 to 2023, among which only 10 BVDV positive were used and 108 were negative lacking the BVDV antigen. An anti-Erns monoclonal antibody-coated protein was used in an indirect antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay (I-ACE) to detect the BVD antigen present in positive BVDV serum specimens. Following gel electrophoresis after RT-PCR, the ten sera samples were 5'UTR gene positive with a band size of 288 bp, which indicates the presence of BVDV persistent infection inside the body of the dairy cattle. In the initial step of the two-step reverse transcription polymerase chain reaction (2 step-RT PCR), the enzyme (superscript III reverse transcriptase) and the primer (random hexamer) were used to convert the RNA of the BVDV into complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) during the process of reverse transcription. The final step involved the amplification of the E2 gene of the resultant BVDV cDNA through gene-specific primers (E2_fwd: 5'-TGGTGGCCTTATGAGAC-3' and P7_rev: 5'-CCCATCATCACTATTTACC-3') and enzyme (platinum taq DNA polymerase high fidelity). For conducting Sanger sequencing, those 3 BVDV-1-positive isolates (about 2.6% of all isolates) were selected as a typical specimen for each site and year between 2019 and 2023 using a proportional computation.

Therefore, only two BVDV isolates with complete genomes were chosen to perform their homological and genetic analysis based on the E2 gene employing Blast and MEGA Version 11 in addition to the Bioedit 7.2.5 program. By applying phylogenetic analysis relying on the E2 gene, a sum of 1011 nucleotides of the BVDV-1 isolates derived from each of the two BVDV-1 Indonesian isolates ($n = 2$) and its 23 reference BVDV strains were acquired from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database were genetically analyzed together via MEGA-11 inside phylogenetic tree. The findings of the genetic analysis inside the phylogenetic tree revealed that the two BVDV Indonesian isolates were clustered into BVDV-1a subgenotype, while the reference BVDV strains were clustered into the five BVDV subgenotype, BVDV-1a ($n = 6$), BVDV-1b ($n = 3$), BVDV-1c ($n = 11$), BVDV-1m ($n = 1$), and BVDV-1n ($n = 2$). The branch exists in phylogenetic tree located before the division of our two BVDV isolates was divided



into two branches with the same maximum bootstrap values of 99%, indicating a high degree of confidence, was seen.

Next, we observed the branch near our study samples, which displayed the bootstrap value of 100, indicating that our 02 isolates were identical. In both isolates, V11 BVDV1/Indonesia/Yogyakarta/2023 and V16 BVDV1/Indonesia/Yogyakarta/2023 with GenBank accession numbers PP836388 and PP836389, respectively, conserved D7E residues were mutated as well as cysteine changed/alterd into serine (S) was identified at amino acid position 201. We identified two isolates of BVDV belonging to the BVDV-1a subgenotype. Our findings indicate that the conserved D7E residues of isolates V11 BVDV1/Indonesia/Yogyakarta/2023 and V16 BVDV1/Indonesia/Yogyakarta/2023 were altered. The Indonesian BVDV isolates exhibited a cysteine to serine mutation at amino acid position 201, which leads to vaccination failure, the range of the animal's host will increase, and the diagnostic kit will not be effective.

Keywords : bovine viral diarrhea virus, cysteine mutation, E2 protein, serine, V11 bovine viral diarrhea virus1, V16 bovine viral diarrhea virus1.