

The Role of Bovine Viral Diarrhea Virus In Bovine Respiratory Disease Complex In Cattle Import Livestock At 2019 Periode

J Susilo¹, J Siswanto¹, *T. Fadrial Karmil², Rusli², M. Nur Salim³, Zainuddin⁴, Ginta Riady⁵, Dasrul⁵, Fakhurrazi⁶, Azhari⁷, Andi Novita⁷

¹Laboratorium Patologi Balai Veteriner Lampung

²Laboratorium Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, B. Aceh

³Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, B. Aceh

⁴Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, B. Aceh

⁵Laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, B. Aceh

⁶Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, B. Aceh

⁷Laboratorium Kesmavet Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, B. Aceh

*Alamat Korespondensi: t.fadrialkarmil@unsyiah.ac.id

ABSTRACT

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is one of the most important infectious diseases in cattle breeding. Bovine respiratory disease complex (BRDC) is a respiratory disease in mature and calf cattle which is a viral and bacterial superinfection including BVDV. The purpose of reseach is to study the role of BVDV in cases of Bovine respiratory disease complex (BRDC), especially with the characteristic of lesions were granulomatous pneumonia. The material in this study was lung tissue that was fixed with 10% formaldehyde buffer of calf sampel collected in October and November 2019. The sample is processed in a pathology laboratory for hematoxyline eosin (HE) staining and followed by immunohistochemical staining (IHC). A total of 11 lung samples sent from imported beef cattle and dairy cattle with a diagnosis of pneumonia complex morphology continued with CPI testing with monoclonal antibodies against bovine viral diarrhea virus. Nine samples showed positive CPI results against BVDV and two other samples were negative. Bovine viral diarrhea virus is detected in all granulomatous pneumonia, so it has an important role in BRDC. Early detection, treatment and prevention of BRDC affected or followed by BVDV must be carried out programmatically.

Keywords: Bovine viral diarrhea virus, Bovine respiratory disease, granulomatous pneumonia, immunohistochemical

PENDAHULUAN

Penyakit pernafasan komplek pada sapi telah diidentifikasi sebagai penyakit menular paling banyak ditemukan pada perusahaan penggemukan dan budidaya sapi di Australia Timur dan di seluruh dunia. Penyakit ini disebabkan oleh beberapa agen penyebab meliputi virus dan bakteri serta kondisi lingkungan yang menjadi faktor predisposisi berkembangnya penyakit pada ternak (Mahony and Horwood, 2007). Agen viral yang menjadi penyebab penyakit ini adalah *Bovine herpesvirus 1* (Infectious Bovine Rhinotracheitis), *bovine viral diare* (bovine pestivirus), virus *Bovine parainfluenza 3* dan *bovine respiratory*

syncytial virus. Agen bakteri penyebab penyakit ini meliputi *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis* dan *Haemophilus somnus* (Ellis, 2001; Booker *et al.*, 2008).

Bovine respiratory disease complex (BRDC) menimbulkan kematian yang sangat signifikan dan menyebabkan tingginya eliminasi pedet di feedlot, serta menimbulkan dampak kerugian ekonomi yang sangat besar pada industry peternakan (Griffin, 1997). Penelitian lain menyebutkan bahwa terjadi peningkatan resistensi antibiotik untuk kasus pneumonia sapi feedlot di Canada Barat dan polyarthritis fibrinosa disebabkan oleh *Mycoplasma bovis* dan bovine viral diarrhea virus (BVDV)

(Nicholas, 2002). Sapi dengan infeksi *M. bovis* menunjukkan *bronchopneumonia chronic* dengan nekrosa dan bronchiectasis, yang terkadang diikuti pleuritis fibrinosa (Adegboye, 1996).

Keuntungan teknik IHK dengan metode ini; ikatan antigen-antibodi terwarnai lebih terang, hasil pewarnaan lebih sensitif, lebih sederhana, tidak menghasilkan warna background non spesifik, dan tidak diperlukan blocking terhadap biotin (Meuten, 2017; Taylor, C.R. and Rudbeck, L., 2013). Keuntungan lainnya metode ini mudah, cepat hasilnya, menghemat biaya dan waktu tenaga laboran / teknisi, hasil memuaskan dan uji yang sangat meyakinkan. Pengujian dengan teknik ini membutuhkan standarisasi internasional agar dapat digunakan di seluruh dunia secara seragam. Kelemahan teknik ini adalah biaya reagen yang cukup mahal (Kennedy, 2010). Teknik diagnosa lain yang dikembangkan, meliputi imunohistokimia (IHK), ke depan diharapkan menjadi pengujian standar dan menjadi perangkat diagnostik yang lebih sensitif (Radostits *et al.*, 2007). Penelitian sebelumnya telah menggunakan teknik IHK untuk menentukan agen penyakit penyebab kematian pada sapi penggemukan (Adegboye *et al.*, 1995; Haines *et al.*, 2001; Haines *et al.*, 2004; Shahriar *et al.*, 2002). Penelitian ini bertujuan melakukan kajian tentang peranan BVDV pada kasus Bovine respiratory disease complex (BRDC) terutama dengan lesi menciri *pneumonia granulomatosa*.

MATERI DAN METODE

Alat yang digunakan untuk pembuatan preparat histopatologi yaitu pisau skalpel, inkubator, *slide glass*, *tissue cassette*, *tissue processor*, *tissue embedding*, mikrotom, *waterbath*, *hot plate*, rak pewarnaan, mikroskop binocular (Olympus, Japan). Alat yang digunakan untuk pembuatan preparat

imunohistokimia meliputi becker glass 500 ml, microwave, hot plate 70°C. Peralatan lain yang digunakan kandang kelinci, spuit ukuran 1 ml dan 10 ml, sentrifus, inkubator, *magnetic stirrer*, gelas beker, *laminary airflow*, lampu bunzen, ose, tabung reaksi, *slide glass* dan mikro pipet.

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah 11 sampel paru pedet dari peternakan sapi potong dan sapi perah impor yang diuji di Laboratorium Patologi Balai Veteriner Lampung. Bahan untuk membuat preparat histopatologi yaitu *buffered neutral formalin* 10%, xylol, ethanol bertingkat (70%, 80%, 90% dan absolut), akuades, paraffin cair, pewarna Hematoxilin dan Eosin, entelan, gelas obyek dan gelas penutup. Bahan untuk imunohistokimia yaitu *glass slide coated polyllysine*, *antigen retrieval solution* (Citrate buffer, pH 6,0), monoclonal antibody terhadap *Bovine viral diarrhea*. Seperangkat kit IHK *Dako envision®+ Dual Link System-HRP (DAB+)* yang terdiri dari dual endogenous enzyme block (0,3% H₂O₂, levamisole dan sodium azide), label polimer-HRP (*goat anti mouse* dan *goat anti rabbit*), substrat buffer (DAB+ substrat buffer) serta DAB+chromogen.

Pembuatan preparat histopatologi dan imunohistokimia dilakukan sesuai dengan yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya (Susilo, 2017). Teknik pewarnaan imunohistokimia berlabel polimer, slide jaringan dideparafinisasi pada xylene 1, 2, 3 masing masing 5 menit. Rehidrasi dilakukan pada ethanol 100% sebanyak 3 kali masing masing 5 menit. Slide dicuci dengan aquadest 5 menit di lanjutkan 5 menit dalam PBS. Aktivitas endogenous peroxidase dan alkaline phosphatase dihambat dengan endogenous enzyme block yang mengandung 3% H₂O₂ selama 30 menit. Slide dicuci dengan PBS 3 kali masing masing 5 menit. Pembukaan epitope (*retrieval antigen*) dengan citrat buffer pada microwave sebanyak 2 kali

masing masing selama 5 menit. Slide dalam larutan citrat buffer ditunggu sampai dingin, dikeringkan dan jaringan pada slide dilingkari dengan Dako pen. Slide dicuci dengan PBS 3 kali masing masing 5 menit. Slide digenangi dengan monoklonal antibodi terhadap BVDV yang diencerkan dako dilluent 1: 400 selama 30 menit pada suhu kamar, kemudian dicuci dengan PBST (0.05% v/v Tween20) 2 kali dan PBS 2 kali masing masing 5 menit. Slide dinkubasi dengan Labelled Polymer-HRP selama 30 menit. Cuci dengan PBST (0.05% v/v Tween20) 2 kali dan PBS 2 kali masing masing 5 menit. Slide diinkubasi pada Subtrat buffer + DAB+ chromogen dengan perbandingan 1 ml subtrat buffer : 20 µl DAB+ chromogen selama 10 menit. Slide dicuci dengan air mengalir 5 menit dan dilakukan counter stain pada hematoxylin selama 2 menit. Slide dicuci dengan air mengalir 5 menit, slide ditetaskan dengan lem DAKO ultramount, ditempatkan pada hot plate suhu 70°C selama 20 menit. Slide dilakukan clearing pada xylene 3 kali masing masing 5 menit diikuti coverslip dan dilakukan pengamatan dengan mikroskop (Taylor and Rudbeck, 2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan histopatologi terhadap 11 sampel paru tersebut secara umum menunjukkan perubahan histopatologi pada paru ditemukan granulomatosus dengan sentra granuloma berwarna eosinofilik berbatas jelas oleh jaringan ikat. Septa interlobularis menebal terisi oleh infiltrasi dan/atau akumulasi netrofil, makrofag, fibrin, dan cairan edema. Perubahan histopatologi dan hasil imunohistokimia sampel paru tersebut ditunjukkan oleh Gambar 1.

Pneumonia granulomatosa merupakan indikator terjadi penyakit pernafasan kompleks. Pengujian imunohistokimia

terhadap 9 sampel *Pneumonia granulomatosa*, seluruhnya menunjukkan reaksi positif terhadap BVDV. Dua sampel *Pneumonia granulomatosa* bereaksi positif terhadap BVDV, *Mycoplasma bovis*, *Pasteurella multocida* dan *mannheimia haemolytica*. *Pasteurella multocida* dan *mannheimia haemolytica* merupakan bakteri oportunistik yang ada di saluran pernafasan atas, dan akan bereplikasi ke paru paru jika ada infeksi primer di paru. Tujuh sampel lainnya bereaksi positif terhadap BVDV dan Bovine Respiratory Syncytial Virus, virus yang sering mengikuti kasus BRDC. Hasil pengujian imunohistokimia dijelaskan dalam Tabel 1.

Peran BVDV pada bovine respiratory disease telah dijelaskan oleh Olafson, MacCallum dan Fox pada 1946. Di Swedia, outbreak respiratory disease berat melibatkan peran BVDV dan Parainfluenza-3. Laporan dari Amerika Serikat, menyebutkan BVDV merupakan virus yang paling banyak diisolasi dari kasus pneumonia dan pada outbreak BRDC. Penelitian oleh Potgeiter *et al.*, pedet yang diinfeksi BVDV tunggal tidak disertai dengan gejala klinis dan perubahan patologi yang berat, dibandingkan dengan pedet yang diinfeksi dengan BVDV dan *P. haemolytica*. Efek sinergis antara BVDV dan *P. haemolytica*, Bovine Herpes Virus-1 dan Bovine Respiratory Syncytial Virus juga sudah banyak diteliti. Hasil penelitian menunjukkan peran BVDV pada BRDC karena faktor immunosupresive (Farshid, 2002). Pedet yang diinfeksi BVDV dan BHV-1 secara bersamaan menimbulkan penyebaran virus secara sistemik, dibandingkan dengan infeksi tanpa BVDV hanya bersifat lokal di paru. Infeksi BVDV juga berkaitan dengan infeksi *Salmonella*, *E. coli*, bovine Seucop stomatitis, rotavirus serta coronavirus.

Penelitian yang dilakukan Shahriar (2002), hubungan antara infeksi virus bovine

viral diarrhea dan *M. bovis* telah dijelaskan. Selain itu, koinfeksi *M. bovis* dan *Mannheimia haemolytica* pada kasus pneumonia pedet di feedlot menciri dengan lesi pneumonia fibrinosuppurative. Penelitian lainnya menyebutkan ada koinfeksi *M. bovis* dengan *Histophilus somni* dan *Pasteurella multocida* pada pedet feedlot (Fulton, 2009).

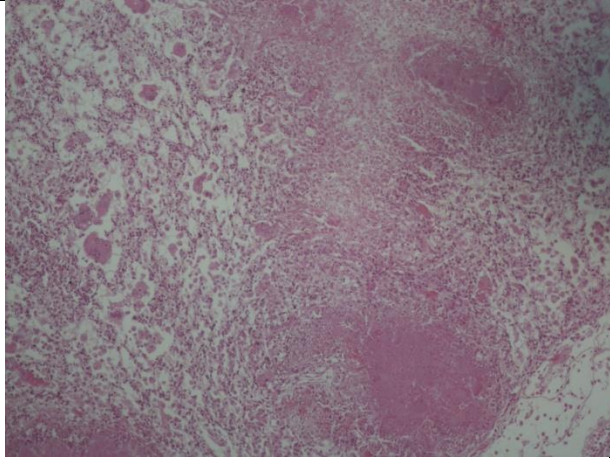
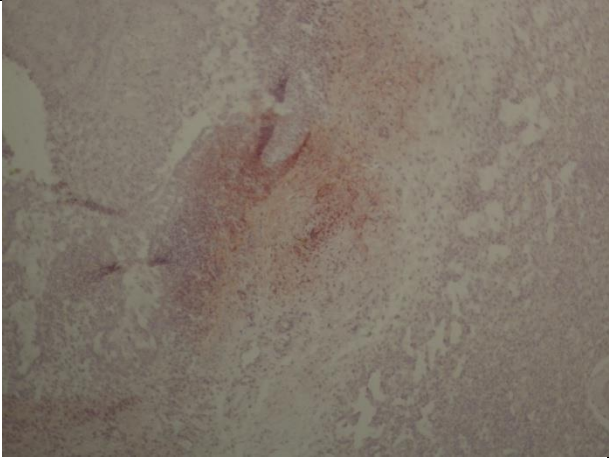
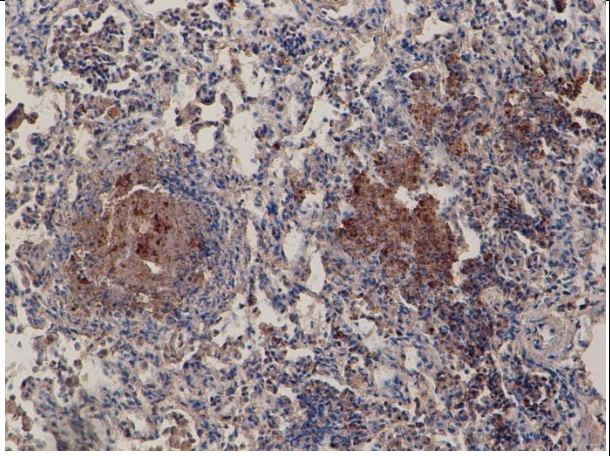
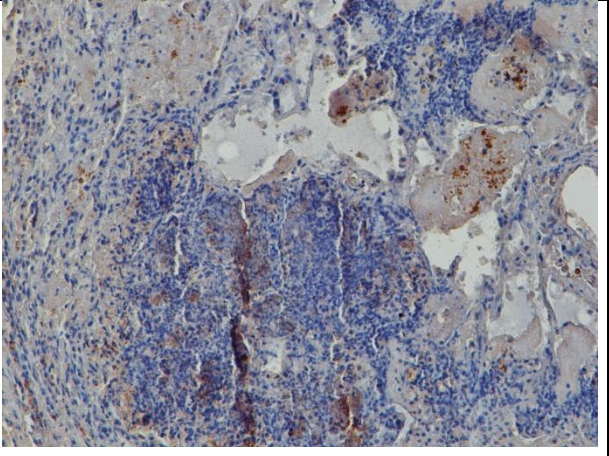
Peran dari infeksi BVDV akut pada bovine respiratory disease complex tidak terlalu jelas; hasil penelitian yang bervariasi dapat diamati melalui beberapa percobaan penelitian melalui saluran reproduksi dengan menggunakan beberapa strains BVDV yang berbeda terhadap penyakit pernafasan pedet (Baker, 1995). Beberapa strain dapat menyebabkan penyebab primer penyakit pernafasan dan menimbulkan gejala pernafasan ringan pada pedet (Archambault, 2000). Beberapa penelitian menunjukkan adanya peran sinergi BVDV pada bovine respiratory disease complex dengan meningkatnya patogenisitas infeksi viral dan leucopeni; hal ini disebabkan karena efek immunosuppressive BVDV pada hospes (Potgieter, 1997; Richer, 1998; Stott, 1980). Kejadian persistent infeksi dan immunosuppressi pada sapi, meningkatkan kerentanan hospes terhadap infeksi sekunder (Potgieter, 1995).

Infeksi BVDV akan menimbulkan efek langsung pada fungsi sistem kekebalan lokal pada paru. Virus akan memperbanyak diri pada makrofag alveolar sapi. Di dalam makrofag alveolar sapi akan ditemukan

BVDV pada kasus infeksi akut pedet, menyebabkan kemampuan fagositosis terhadap 4eucopen dan ekspresi perangkat pertahanan lain seperti compliment receptors (C3R) dan 4eucopen Fc receptors (FcR) akan menurun secara signifikan jika dibandingkan dengan pedet yang sehat. Infeksi makrofag alveolar menimbulkan BVDV menginfeksi makrofag sehingga memproduksi procoagulant dan terbentuk fibrin (Olchoway *et al*). meningkatnya pembentukan fibrin pada alveoli menjadikan replikasi infeksi sekunder 4eucopen menjadi sangat leluasa. Peran terpenting BVDV pada BRDC dengan menekan fungsi sistem kekebalan lokal di paru, sehingga diikuti dengan infeksi sekunder bakteri pathogen.

Mekanisme immunosuppresif melinatkan beberapa aspek sistem kekebalan tubuh. Limfosit dan makrofag menjadi target khusus BVDV. Secara sistematis, infeksi akut oleh BVDV menyebabkan 4eucopenia dengan deplesi sel lymphoid. Penurunan level CD4⁺ dan CD8⁺ T-lymphocytes, B-lymphocytes dan netrofil juga terjadi. Penelitian secara *in vitro* menyebabkan immunosupresif diikuti penurunan respon infeksi limfosit dalam menstimulasi mitogen, menurunkan produksi interferon, menurunkan interleukin-1, interleukin-2 dan produksi tumor nekrosis factor-alpha dan penurunan respon chemotaksik oleh monosit. Respon netrofil dari infeksi BVDV dengan melemahnya myeloperoxidase, halide, dan sistem hydrogen peroxide yang bersifat bakterisidal.

Gambar 1. Perubahan histopatologi dan immunohistokimia sampel paru.

	
Pedet 60401, menunjukkan <i>bronchopneumonia</i> dan <i>pneumonia granulomatosa</i> (HE)	Pedet 60401, immunohistokimia positif terhadap BVDV, <i>Mycoplasma bovis</i> , <i>Pasteurella multocida</i> dan <i>Mannheimia haemolytica</i> (SB)
	
Pedet 50897, immunohistokimia positif terhadap BVDV dan BRSV (SB)	Pedet 50865, immunohistokimia positif terhadap BVDV dan BRSV (SB)

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan histopatologi dan imunohistokimia kasus Bovine respiratory disease complex pada sapi.

Kode sampel	Breed	Umur	Diagnosa Morfologi	Imunohistokimia
60401	FH	< 3 bulan	Severe pneumonia granulomatosa	BVD (+), M.b (+), P.m (+), M.h (+)
60413	FH	< 3 bulan	Severe pneumonia granulomatosa	BVD (+), M.b (+), P.m (+), M.h (+)
229	FH	3 tahun	Severe pneumonia interstitialis	BVD (-), BRSV (-)
4589	BX	< 3 bulan	Severe pneumonia hemoragika	BVD (-), BRSV (-)
6264	BX	< 3 bulan	Severe pneumonia granulomatosa	BVD (+), BRSV (+)
6602	BX	< 3 bulan	Severe pneumonia granulomatosa	BVD (+), BRSV (+)
7521	BX	< 3 bulan	Severe pneumonia granulomatosa	BVD (+), BRSV (+)
7748	BX	< 3 bulan	Severe pneumonia granulomatosa	BVD (+), BRSV (+)
50908	FH	2 bulan	Severe pneumonia granulomatosa	BVD (+), BRSV (+)
50897	FH	2 bulan	Severe pneumonia granulomatosa	BVD (+), BRSV (+)
50865	FH	2 bulan	Severe pneumonia granulomatosa	BVD (+), BRSV (+)

BRSV = *Bovine Respiratory Syncytial Virus*

BVD = *Bovine Viral Diarrhea*

P.m = *Pasteurella multocida*

M.h = *Mannheimia haemolytica*

M.b = *Mycoplasma bovis*,

KESIMPULAN

Bovine viral diarrhea virus memiliki peran utama dalam BRDC. Immunosupresif yang ditimbulkan oleh BVDV memicu infeksi sekunder patogen virus lainnya (BRSV, PI3, Corona virus, Adeno virus) dan agen bacterial lain (*Mycoplasma bovis*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somnii*, *Archanobacterium pyogenes*)

Rekomendasi dan tindak lanjut: pentingnya dilakukan deteksi reaktor BVDV dengan status persistent infection, dilakukan culling, melakukan biosecurity ketat, dan vaksinasi pada sapi breeding. Pengadaan sapi import harus dipersyaratkan bebas penyakit BVDV.

DAFTAR PUSTAKA

- Adegboye DS, P.G. Halbur, D.L. Cavanaugh. 1995. Immunohistochemical and pathological study of *Mycoplasma bovis* associated lung abscesses in calves. *J Vet Diagn Invest* 1995;7:333–337.
- Adegboye, DS, P.G. Halbur, R.G. Nutsch, R.G. Kadlec, R.F. Rosenbusch. 1996. *Mycoplasma bovis*-associated pneumonia and arthritis complicated with pyogranulomatous tenosynovitis in calves. *J Am Vet Med Assoc*; 209:647–649.
- Archambault, D, C. Beliveau, Y. Couture, S. Carman S. 2000. Clinical response and immunomodulation following experimental challenge of calves with type 2 noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *Vet. Res*;31:215–27.
- Baker, J.C. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*;11:425–445.
- Baule, C, G. Kulcsar G, K. Belak. 2001. Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of bovine viral diarrhea virus type I. *J Clin Microbiol*;39:146–53.
- Booker, C.W., S.M. Abutarbush, P.S. Morely, G.K. Jim. 2008. Microbiological and histopathological findings in cases of fatal bovine respiratory disease of feedlot cattle in western Canada. *Can. Vet. J.* 49:473–481.

- Ellis, J.A. 2001. The immunology of the bovine respiratory disease complex. *Vet. Clin. Food Anim.* 17:535–549.
- Farshid, M., Shahriar, Edward, G., Clark, Eugene, J., Keith, W., W. Gary, W. 2002. Coinfection with bovine viral diarrhea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. *Can Vet J* Volume 43.
- Griffin, D. 1997. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*;13:367–377.
- Gourlay RN, Thomas LH, Wyld SG. 1989. Increased severity of calf pneumonia associated with the appearance of *Mycoplasma bovis* in a rearing herd. *Vet Rec*;124:420–422.
- Haines DM, Martin MK, Clark EG, Kee Jim G. 2001. The immunohistochemical detection of *Mycoplasma bovis* and bovine virus diarrhea virus in tissues of feedlot cattle with chronic unresponsive respiratory disease and/or arthritis. *Can Vet J*;42:857–860.
- Mahony, T.J. and Horwood, P.F. 2007. *Rapid detection of Bovine Respiratory Disease Pathogens*. Meat & Livestock Australia Limited. North Sydney
- Potgieter LND, McCracken MD, Hopkins FM, Walker RD, Guy JS. 1984. Experimental production of bovine respiratory tract disease with bovine viral diarrhea virus. *Am J Vet Res*;45: 1582–1585.
- Potgieter LND. 1997. Bovine respiratory tract disease caused by bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*; 13:471–481.
- Potgieter LND. 1995. Immunology of bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*;11:501–520.
- Richer L, Marios P, Lamontagne L. 1988. Association of bovine viral diarrhea virus with multiple viral infections in bovine respiratory disease outbreaks. *Can Vet J*;29:713–717.
- Stott EJ, Thomas LH, Collins AP, et al. 1980. A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease. *J Hyg*;85:257–270.
- Rodriguez F, Bryson DG, Ball HJ, Forster F. 1996. Pathological and immunohistochemical studies of natural and experimental *Mycoplasma bovis* pneumonia in calves. *J Comp Pathol*; 115:151–162.
- Susilo, J., Kurniasih, Amanu, S. 2017. *Pengembangan Immunohistokimia untuk Deteksi Pasteurella multocida pada Kasus Pneumonia Enzootika Pedet di Balai Veteriner Lampung*. Thesis, Magister Sain Veteriner UGM Yogyakarta
- Taylor, C.R., Rudbeck, L. 2013. *Immunohistochemical Staining Methods Sixth Edition*. Denmark : Dako Press
- Thomas LH, Howard CJ, Stott EJ, Parsons KR. 1986. *Mycoplasma bovis* infection in gnotobiotic calves and combined infection with respiratory syncytial virus. *Vet Pathol*;23:571–578.