

ISSN 0216-6461
e-ISSN 2354-6832
Terakreditasi Kemenristekdikti
SK Dirjen Risbang No. 21/E/KPT/2018

WARTAZOA

Buletin Ilmu Peternakan dan Kesehatan Hewan Indonesia
Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences

Volume 29
Nomor 3
September 2019



**PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PETERNAKAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN
KEMENTERIAN PERTANIAN**

ISSN 0216-6461
e-ISSN 2354-6832

Terakreditasi Kemenristekdikti
SK Dirjen Risbang No. 21/E/KPT/2018

WARTAZOA

Buletin Ilmu Peternakan dan Kesehatan Hewan Indonesia
Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences

Volume 29
Nomor 3
September 2019



**PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PETERNAKAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN
KEMENTERIAN PERTANIAN**

WARTAZOA

Buletin Ilmu Peternakan dan Kesehatan Hewan Indonesia

Volume 29 Nomor 3 Tahun 2019

ISSN 0216-6461

e-ISSN 2354-6832

Terakreditasi Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi

SK Dirjen Penguatan Riset dan Pengembangan No. 21/E/KPT/2018

Diterbitkan oleh:

Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
bekerjasama dengan
Ikatan Sarjana Peternakan Indonesia

Penanggung Jawab:

Kepala Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan

Dewan Penyunting:

Ketua:

Dr. Elizabeth Wina, MSc. (Peneliti Ahli Utama – Balai Penelitian Ternak – Pakan dan Nutrisi Ternak)

Wakil Ketua:

Drh. Rini Damayanti, MSc. (Peneliti Ahli Utama – Balai Besar Penelitian Veteriner – Patologi dan Toksikologi)

Anggota:

Dr. Ir. Atien Priyanti SP, MSc. (Peneliti Ahli Utama – Puslitbangnak – Ekonomi Pertanian)
Drh. Indrawati Sendow, MSc. (Peneliti Ahli Utama – Balai Besar Penelitian Veteriner – Virologi)
Dr. Ir. Bess Tiesnamurti, MSc. (Peneliti Ahli Utama – Puslitbangnak – Pemuliaan dan Genetika Ternak)
Ir. Mariyono, MSi. (Peneliti Ahli Madya – Loka Penelitian Sapi Potong – Pakan dan Nutrisi Ternak)
Dr. Drh. Eny Martindah, MSc. (Peneliti Ahli Utama – Balai Besar Penelitian Veteriner – Parasitologi dan Epidemiologi)
Dr. Drh. Susan Maphiliandawati Noor, MVSc. (Peneliti Ahli Madya – Balai Besar Penelitian Veteriner – Bakteriologi)
Ir. Juniar Sirait, MSi. (Peneliti Ahli Madya – Loka Penelitian Kambing Potong – Pakan dan Nutrisi Ternak)
Dr. Wisri Puastuti, SPT., MSi. (Peneliti Ahli Madya – Balai Penelitian Ternak – Pakan dan Nutrisi Ternak)

Mitra Bestari:

Prof. (Riset) Dr. Ir. Tjeppey D Soedjana, MSc. (Puslitbangnak – Ekonomi Pertanian)
Prof. Dr. Edy Rianto, MSc. (Universitas Diponegoro – Ilmu Ternak Potong dan Kerja)
Prof. Dr. Gono Semiadi (LIPI – Pengelolaan Satwa Liar)
Dr. Agr. Asep Anang, MPhil. (Universitas Padjadjaran – Pemuliaan Ternak)
Dr. Ir. VM Ani Nurgartiningih, MSc. (Universitas Brawijaya – Pemuliaan dan Genetika Ternak)

Penyunting Pelaksana:

Nandi Hendriana, ST, MKom.
Ivoni Christyani Sembiring, SSos.
Pringgo Pandu Kusumo, AMd.
Muhamad Indra Fauzy, AMd.

Alamat:

Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan
Jalan Raya Pajajaran Kav. E-59, Bogor 16128 – Indonesia
Telepon (0251) 8322185; Faksimile (0251) 8380588
E-mail: wartazoa@litbang.pertanian.go.id; wartazoa@yahoo.co.id
Website: <http://medpub.litbang.pertanian.go.id/index.php/wartazoa>

Wartazoa diterbitkan empat kali dalam setahun pada bulan Maret, Juni, September dan Desember

KATA PENGANTAR

Penyakit zoonosis merupakan penyakit yang sangat menakutkan karena dapat menular pada hewan dan manusia. Salah satunya adalah penyakit Glanders yang disebabkan oleh bakteri *Burkholderia mallei*. Status glanders di Indonesia sampai saat ini masih dinyatakan bebas, namun terdeteksi antibodi positif terhadap *B. mallei* pada kuda. Etiologi dan ekologi glanders pada kuda perlu dipelajari untuk meningkatkan kewaspadaan *emerging* glanders. Penyakit zoonosis lainnya adalah penyakit *West Nile* yang disebabkan oleh virus *West Nile* yang merupakan virus RNA. Data penelitian penyakit *West Nile* di Indonesia masih sangat terbatas sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk dapat memprediksi, mencegah dan mengendalikan infeksi virus *West Nile* di Indonesia. Penyakit lain yang umum terjadi pada unggas tapi belum mendapat perhatian adalah penyakit koksidiosis pada sapi. Oleh sebab itu, perlunya diuraikan tentang penyakit koksidiosis yang disebabkan oleh protozoa *Eimeria* spp. pada sapi, ditinjau dari aspek etiologi, faktor predisposisi, metode diagnosis dalam upaya penanggulangan penyakit.

Produktivitas ternak ditentukan oleh reproduksi ternak betina dan pejantannya. Salah satu kualitas sperma yaitu motilitas merupakan parameter yang sangat penting karena menentukan keberhasilan kebuntingan ternak betina. Penilaian motilitas spermatozoa dapat dilakukan dengan manual (subyektif) atau dengan Computer-assisted *sperm analysis* (CASA). Ada beberapa faktor yang perlu diketahui karena mempengaruhi penilaian motilitas sperma bila menggunakan CASA. Ketersediaan dan kualitas lahan untuk hijauan pakan ternak di Indonesia menentukan produktivitas ternak. Ketersediaan lahan bekas tambang batubara cukup menjanjikan tetapi perlu dievaluasi apakah layak untuk menghasilkan hijauan yang aman dengan kualitas yang baik bagi ternak.

Demikianlah informasi singkat mengenai isi Wartazoa no 3 dan semoga informasi ini bermanfaat untuk kewaspadaan kita semua terhadap penyakit-penyakit hewan terutama yang zoonosis dan juga bermanfaat untuk pengembangan ternak sapi di Indonesia.

Bogor, September 2019

Ketua Dewan Penyunting

WARTAZOA

Buletin Ilmu Peternakan dan Kesehatan Hewan Indonesia

Volume 29 Nomor 3 (September 2019)

ISSN 0216-6461

e-ISSN 2354-6832

DAFTAR ISI

Halaman

Kewaspadaan terhadap Munculnya Penyakit Glanders pada Kuda di Indonesia (Awareness of Emerging Glanders in Horses in Indonesia) Susan M Noor dan T Ariyanti	109-118
Karakteristik Biologis Virus West Nile dan Keterkaitannya dengan Perkembangan Obat Antiviral dan Vaksin (Biological Characteristics of West Nile Virus and Its Correlation with the Development of Antiviral Drugs and Vaccines) Diana Nurjanah dan NLPI Dharmayanti	119-132
Penyakit Koksiidosis pada Sapi di Indonesia dan Perkembangan Teknik Diagnosis (Coccidiosis Disease in Cattle in Indonesia and Development of Diagnostic Techniques) Fitrine Ekawasti dan AH Wardhana	133-144
Faktor-faktor yang Mempengaruhi Analisis Motilitas Spermatozoa dengan Menggunakan CASA (Factors Affecting Spermatozoa Motility Analysis Using CASA) Dian Ratnawati, N Isnaini, T Susilawati	145-152
Pengembangan Tanaman Pakan Ternak di Lahan Bekas Tambang Batubara dalam Mendukung Usaha Peternakan (Forage Development on Ex-Coal Mining Land to Support of Livestock Business) Harmini	153-160

Karakteristik Biologis Virus West Nile dan Keterkaitannya dengan Perkembangan Obat Antiviral dan Vaksin

(Biological Characteristics of West Nile Virus and Its Correlation with the Development of Antiviral Drugs and Vaccines)

Diana Nurjanah dan NLPI Dharmayanti

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
Kontributor utama: diananurjanah@gmail.com

(Diterima 7 Juli 2019 – Direvisi 30 Juli 2019 – Disetujui 22 Agustus 2019)

ABSTRACT

West Nile virus (WNV) is a zoonotic RNA virus. Its genome encodes 3 structural and 7 non-structural proteins. Mutations can occur in both structural and non-structural proteins of the virus. Mutations can enhance the pathogenicity and virulence, but some mutations are beneficial for the development of vaccines. Licensed vaccines are only available for horses, while vaccines for humans are still under development. In Indonesia, WNV infection was detected in 2014 in West and East Java, but vaccines and antiviral drugs in both animals and humans are not yet available. This paper describes the characteristic of structural and non-structural proteins of WNV and its correlation with mutations and the development of vaccines and antiviral drugs. Molecular identification and further research are needed to predict, prevent and control WNV infections in vectors, susceptible animals and humans.

Key words: West Nile virus, zoonotic, mutation, vaccines, antiviral drugs

ABSTRAK

Virus West Nile (WNV) merupakan virus RNA yang bersifat zoonosis. Genom WNV mengkode 3 protein struktural dan 7 protein non struktural. Kejadian mutasi dapat terjadi baik pada protein struktural maupun protein non-struktural virus. Mutasi pada WNV mampu mempengaruhi patogenitas dan virulensi virus, namun beberapa mutasi bersifat menguntungkan sehingga dimanfaatkan untuk pengembangan vaksin. Vaksin terlisensi hanya tersedia untuk kuda, sedangkan vaksin pada manusia masih dalam tahap pengembangan. Di Indonesia, infeksi virus ini berhasil dideteksi pada tahun 2014 di Jawa Barat dan Jawa Timur, namun vaksin dan obat antiviral baik pada hewan dan manusia belum tersedia. Tulisan ini menguraikan tentang karakter protein struktural dan non-struktural WNV serta keterkaitannya dalam kejadian mutasi dan pengembangan vaksin serta obat antiviral. Identifikasi molekuler perlu dilakukan untuk dapat memprediksi, mencegah dan mengendalikan kejadian infeksi virus West Nile baik pada vektor, hewan peka maupun manusia.

Kata kunci: Virus West Nile, zoonosis, mutasi, vaksin, obat antiviral

PENDAHULUAN

Virus West Nile (WNV) merupakan virus zoonosis yang bersirkulasi di antara nyamuk, burung, kuda, manusia dan vertebrata lain (Murray et al. 2010). Burung berperan sebagai reservoir alami dan nyamuk dari genus *Culex* bertindak sebagai vektor transmisi dari virus ini (Eastwood et al. 2011; Gamino & Höfle 2013). Manusia dan kuda sebagai inang insidental (*dead-end host*) tidak terlibat dalam siklus transmisi (Venter et al. 2010; CDC 2019). Virus West Nile termasuk ke dalam kompleks *Japanese Encephalitis* (JE) dalam famili *Flaviviridae*, genus *Flavivirus* (Fall et al. 2017). Kasus infeksi pada manusia pertama kali ditemukan di Uganda pada tahun 1937 (Hughes et al. 1940), sedangkan infeksi pada kuda pertama kali ditemukan di USA pada Oktober 1999 (Ostlund et al.

2001). Gejala klinis WNV pada manusia bervariasi, mulai dari asimtomatis/ demam akut ringan hingga gejala neurologis akibat ensefalitis (Murgue et al. 2002).

Wabah yang bersifat masif pertama kali dilaporkan pada tahun 2002-2003 dengan kasus infeksi mencapai 2.946 dan 284 di antaranya bersifat fatal. Wabah masif lainnya terjadi pada tahun 2012 dan pada tahun 2018. Wabah pada tahun 2018 terjadi di Eropa dengan kejadian infeksi lebih dari 2.000 kasus dan 181 kasus bersifat fatal (Rosenberg et al. 2018; Barrett 2018; CDC 2019). Hingga Januari 2019, kejadian WNV pada manusia di USA dilaporkan menginfeksi sebanyak 2.647 orang, 1.658 di antaranya bersifat *neuroinvasive* dan sisanya sebanyak 989 kasus diklasifikasikan sebagai penyakit *non-neuroinvasive* (CDC 2019). Pasien dengan gangguan sistem

kekebalan, orang lanjut usia dan anak-anak memiliki risiko terinfeksi virus ini dengan tingkat keparahan yang lebih tinggi sehingga dapat berakibat fatal (Evans & Seeger 2007).

Tindakan pencegahan dengan vaksin terlisensi hanya tersedia untuk hewan, khususnya kuda (Iyer & Kousoulas 2013), sedangkan vaksin untuk manusia masih dalam tahap pengembangan (Monath 2006). Virus West Nile merupakan virus RNA beruntai tunggal dengan angka mutasi yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan virus DNA (Armstrong et al. 2011). Mutasi dianggap berperan dalam peningkatan virulensi dan penurunan efikasi vaksin yang sudah tersedia. Namun, beberapa kejadian mutasi bersifat menguntungkan sehingga dimanfaatkan untuk pengembangan vaksin yang poten. Keterbatasan vaksin dalam menimbulkan antibodi protektif pada pasien dengan gangguan kekebalan serta lamanya waktu yang dibutuhkan untuk menghasilkan vaksin yang sesuai melatarbelakangi pengembangan terapi antiviral untuk WNV. Kejadian infeksi WNV di Indonesia terdeteksi pada tahun 2014. Infeksi tersebut ditemukan dari isolat Bandung tahun 2004 dan wabah yang menjangkit 12 orang pasien rumah sakit di Surabaya (Myint et al. 2014; Nurcahyani 2014). Penelitian WNV di Indonesia masih sangat terbatas. Kesenjangan pengetahuan mengenai aspek penting dari virus dan belum tersedianya vaksin serta antiviral untuk manusia membatasi kemampuan dalam memprediksi, mencegah dan mengendalikan infeksi WNV di Indonesia.

KARAKTERISTIK BIOLOGIS

Struktur virus

Famili *flaviviridae* terdiri dari 4 genus di antaranya *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* dan *Pegivirus*. *Flaviviridae* memiliki bentuk sferis dengan diameter 40-60 nm, beramplop dan nukleokapsidnya berbentuk ikosahedral (MacLachlan et al. 2017). Genus *Flavivirus* dari famili *Flaviviridae* memiliki rentang inang yang cukup luas karena dapat bereplikasi baik pada sel vertebrata maupun invertebrata (Cook & Holmes 2006). Berdasarkan rentang inang dan spesies vektor, genus ini dapat dibagi ke dalam 4 kelompok berbeda yaitu *mosquito-borne*, *tick-borne*, *no known vector* dan *insect specific*. Virus yang ditransmisikan melalui nyamuk (*mosquito-borne*) dapat diklasifikasikan menjadi *clade encephalitis* atau JE serocomplex yang terdiri dari WNV dan virus *Japanese Encephalitis* sedangkan *clade non encephalitic* atau demam berdarah terdiri dari virus *Dengue* dan virus *Yellow Fever* (Colpitts et al. 2012).

Genom

Virus *West Nile* (WNV) memiliki diameter 40-50 nm dengan genom ssRNA berpolaritas positif sekitar 11 kb yang mengkode tiga protein struktural yaitu kapsid (protein C), *envelope* (protein E) dan premembran (protein PrM) serta 7 protein non-struktural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, dan NS5) (Hayes & Gubler 2006).

Protein E

Protein E merupakan protein struktural *envelope* yang penting secara imunologis dan menjadi target utama respon imun inang. Protein E bertanggungjawab dalam *viral attachment*, fusi membran dan pembentukan virion (Wang et al. 2001; Zhang et al. 2017). Protein ini memiliki berat molekul 53 kD dan merupakan glikoprotein membran tipe I dengan 12 residu sistein yang *conserved*. Protein E memiliki 3 domain yaitu domain 1 (DI), domain 2 (DII) dan domain 3 (DIII) serta domain transmembran helix (TMD) (Zhang et al. 2017).

DI merupakan pusat domain struktur dengan 120 residu pada 3 segmen yang terletak di antara DII dan DIII. Sebagai pusat domain, DI memiliki fungsi sebagai stabilisator orientasi protein E secara keseluruhan dan berpartisipasi dalam perubahan konformasinya. Situs *glycosylation* domain ini dihubungkan dengan produksi virus, sensitivitas pH dan sifat *neuroinvasive* (Zhang et al. 2017). DII merupakan domain dimerisasi yang disusun oleh 12 asam amino yang berperan dalam fusi dan pengikatan membran sel-virus. DIII yang menjangkau asam amino 296-415 berfungsi dalam pengenalan dan pengikatan reseptor. Domain ini menjadi fokus dalam pengembangan vaksin karena memiliki *multiple* epitop yang dikenali oleh antibodi netralisasi (Beasley & Barrett 2002; Pokidysheva et al. 2006; Iyer & Kousoulas 2013). Berdasarkan fungsi dari DIII, protein E dapat digunakan untuk mengkarakterisasi WNV *neuroinvasive* dan *non-neuroinvasive* dengan sekuensing nukleotidanya (Rice et al. 1998). Domain transmembran helix terdiri dari TM1 dan TM2. Keduanya memiliki fungsi yang penting dalam biosintesis dan proses dari poliprotein virus, TM1 bertindak sebagai sekuen *stop-transfer* sedangkan TM2 berperan sebagai sekuen sinyal internal untuk translokasi protein NS1 pertama ke dalam lumen retikulum endoplasmik (Fritz et al. 2011).

Protein C

Protein C merupakan protein struktural kecil dengan berat molekul 12-14 kD, bermuatan positif dan

disebut sebagai protein inti. Protein ini membentuk komponen struktural nukleokapsid dan terlibat dalam RNA *folding* selama replikasi (Ferlenghi et al. 2001; Zhang et al. 2007). Protein kapsid juga terlibat dalam berbagai peran non-struktural selama siklus replikasi, termasuk replikasi RNA, translasi, infektivitas dan viabilitas virus. Fungsi non-struktural tersebut diperoleh dengan memodulasi *signaling pathways* sel inang karena protein C adalah protein virus yang pertama kali berinteraksi dengan protein sel inang di sitoplasma. Protein ini juga ikut berperan dalam aktivitas anti-apoptosis sehingga mampu meningkatkan *signaling prosurvival* selama terjadinya infeksi virus (Hunt et al. 2007; Bhuvanakantham et al. 2009; Urbanowski & Hobman 2013). Penelitian yang dilakukan oleh van Marle et al. (2007) menunjukkan bahwa protein kapsid memiliki peran dalam neuropatogenesis karena mampu menginduksi neuroinflamasi melalui peningkatan CXCL10 dan CCL2 baik secara *in vivo* maupun *ex vivo*.

Protein PrM

Protein premembran merupakan protein struktural glikosilasi transmembran pendek yang memiliki fungsi melindungi protein E dari fusi awal dengan membran sel inang di dalam vesikel golgi kompleks (Chambers 1990; Tan et al. 2009; Setoh et al. 2012). Protein ini merupakan prekursor protein membran yang diekspresikan pada permukaan virion di sepanjang protein E. Pada virus *immature*, protein ini melapisi *fusion loop* protein E (Elshuber 2003; Zybert et al. 2008; Luo et al. 2015). Pada proses perakitan virus, protein E dan PrM membentuk heterodimer sebelum berinteraksi dengan kompleks nukleokapsid untuk menghasilkan virus *immature*. Protein PrM kemudian mengalami pembelahan oleh *furin like protease* inang yang terjadi di dalam transgolgi untuk menghasilkan virus *mature* melalui *exocytosis* (Zhang 2003; Li et al. 2008; Zhang et al. 2013). Modulasi proporsi pembelahan tersebut dapat merangsang sensitivitas antibodi ternetralisasi (Nelson et al. 2008). Protein PrM WNV memiliki situs *N-Linked glycosylation* tunggal yang berada pada asam amino 15-17 dan ablasi dari motif *glycosylation* ini dapat merubah pelepasan dan infektivitas partikel virus (Hanna et al. 2005). Protein PrM WNV dianggap penting dalam pembentukan dan sekresi virus serta berperan dalam peningkatan virulensi virus (Chambers 1990; Tan et al. 2009; Setoh et al. 2012).

Protein NS

Protein non-struktural bersifat multifungsi dan memiliki peran penting dalam sintesis dan/atau

perakitan virus (Colpitts et al. 2012). Protein NS1 merupakan glikoprotein yang memiliki 3 situs *N-Linked glycoprotein* yang sangat *conserved*. Protein NS1 disekresi oleh sel terinfeksi dengan *multiple* sistein yang membentuk ikatan disulfida (Londono-Renteria & Colpitts 2016). Protein NS1 mengalami proteolisis di retikulum endoplasmik dan terdimerisasi. Bentuk dimer protein NS1 diangkut ke sel lain melalui beberapa mekanisme di antaranya melalui membran retikulum endoplasmik (mNS1), membran plasma bagian luar (pNS1) dan medium ekstraseluler dalam bentuk terlarut (sNS1). Dalam bentuk terlarutnya, 3 buah dimer NS1 akan bersatu membentuk heksamer NS1 (Alcalá et al. 2017; Alcalá et al. 2018). Protein ini bersifat sangat imunogenik sehingga menjadi target utama dari antibodi inang. Protein NS1 intraseluler berperan sebagai kofaktor esensial untuk replikasi virus, bersifat antagonis terhadap aktivitas komplemen dan menghambat *signaling* TLR3 (Martín-Acebes 2012; Chancey et al. 2015). Protein NS1 yang berhubungan dengan plasma membran (pNS1) dan dalam bentuk terlarut (sNS1) berperan dalam patogenitas virus (Alcalá et al. 2017; Alcalá et al. 2018).

Protein NS2A merupakan protein transmembran hidrofobik yang berukuran kecil (25 kD) dengan peran sebagai kofaktor untuk replikasi virus, pembentukan struktur membran, perakitan virus, regulasi respon imun inang dan diseminasi virus meskipun tidak memiliki fungsi enzimatis (Chancey et al. 2015; Londono-Renteria & Colpitts 2016). Colpitts et al. (2012) menyatakan bahwa protein NS2A bersama dengan protein NS2B, NS4A dan NS4B mampu menghambat respon imun bawaan inang ketika terjadi infeksi virus dengan mekanisme hambatan produksi interferon α/β . Mutasi pada protein ini mampu menyebabkan atenuasi virus secara *in vivo* (Martín-Acebes 2012).

Protein NS2B merupakan protein hidrofobik kecil yang berperan sebagai kofaktor protease NS3 dan berfungsi sebagai *membrane anchor* protease virus (Martín-Acebes 2012). Tiga membran domain pada terminal C dan N protein NS2B berperan penting dalam penyatuan kompleks protease ke dalam membran yang terinduksi virus (Londono-Renteria & Colpitts 2016).

Protein NS3 merupakan protein terbesar kedua setelah NS5 yang sangat *conserved* dan memiliki banyak fungsi enzimatis. N-terminal protein ini mengkode viral *trypsin-like* serine protease yang mampu membelah poliprotein virus untuk melepaskan protein struktural dan non-struktural. Aktivitas enzimatis lainnya yang esensial untuk replikasi WNV yaitu NS3 helicase, nucleoside triphosphatase dan RNA triphosphatase. Berdasarkan fungsi enzimatisnya, protein NS3 menjadi komponen kunci dalam proses

replikasi virus, sehingga perubahan pada protein ini dapat menyebabkan terganggunya proses replikasi virus. Protein NS3 hanya dapat aktif dengan keberadaan kofaktornya yaitu NS2B. Bentuk aktifnya NS2B/NS3 merupakan komponen yang esensial untuk replikasi dan perakitan virus serta menjadi target antivirus yang menjanjikan (Ebel et al. 2011; Martín-Acebes 2012; Londono-Renteria & Colpitts 2016).

Protein NS4A dan NS4B merupakan protein hidrofobik berukuran kecil dengan beberapa domain yang terikat pada *viral replication complex* di membran yang terinduksi virus. Protein NS4A berperan sebagai kofaktor yang meregulasi aktivitas ATP-ase NS3 helicase dan berperan dalam pengurutan sinyal untuk translokasi protein NS4B melalui membran retikulum endoplasmik. Protein NS4A bersama dengan protein NS4B dan NS2A berperan dalam penghambatan *signaling interferon* pada sel terinfeksi virus. Protein NS4B yang memiliki fungsi penting dalam kompleks replikasi *flavivirus* dapat ditemukan pada membran perinuklear dan nukleus dari sel terinfeksi virus. Mutasi pada protein ini menghasilkan sifat atenuasi WNV secara *in vivo* (Martín-Acebes 2012; Wicker et al. 2012; Londono-Renteria & Colpitts 2016).

Protein NS5 merupakan protein terbesar dengan ukuran 100 kDa dengan 2 aktivitas enzimatis yaitu N-terminal domain dan C-terminal domain. N-terminal domain mengkode metiltransferase sedangkan C-terminal domain mengkode *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRP) yang bertanggungjawab terhadap replikasi virus. Metiltransferase dan polimerase protein NS5 merupakan target antiviral yang menjanjikan (Londono-Renteria & Colpitts 2016). Protein NS5 memiliki fungsi sebagai antagonis interferon (IFN) utama dengan mekanisme hambatan pY-STAT 1 (*IFN-Dependent STAT 1 phosphorylation*) atau dengan degradasi STAT 2 dan penekanan ekspresi gen *IFN-dependent*. Berkaitan dengan fungsinya sebagai antagonis IFN, mutasi alami protein NS5 WNV mungkin memiliki pengaruh terhadap virulensi WNV asal lapang sehingga dapat digunakan dalam pengembangan vaksin *live attenuated* atau terapi antiviral di masa mendatang (Laurent-Rolle et al. 2010).

Lineage virus West Nile

Berdasarkan filogenetika molekuler, WNV dibagi menjadi 5 *lineage* dan 3 *putative lineage* (Pachler et al. 2014). Kejadian encephalitis pada manusia dikaitkan dengan *lineage* 1, 2 dan 5 (Petersen et al. 2013; Zohaib et al. 2019). Strain pada *lineage* 1 terbagi ke dalam *clade* 1a, 1b dan 1c. *Clade* 1a ditemukan pada isolat Afrika, Eropa dan Amerika. *Clade* ini memiliki kedekatan hubungan genetik di antara daerah yang jaraknya berjauhan secara geografis sehingga dianggap

sebagai akibat penyebaran virus melalui burung migrasi (Martín-Acebes 2012). *Lineage* 1 berasal dari sub-sahara atau Afrika Utara yang mewabah pada awal abad 20 dan menyebar ke utara pada tahun 1970-1980-an.

Pada tahun 1990, strain WNV *clade* 1a menyebabkan wabah sporadis ringan di Maroko dan Eropa Barat. Virus West Nile menyebar ke Amerika dan menjadi masalah kesehatan yang bersifat global. Isolat asal Amerika Utara pada awal kejadian berhasil diidentifikasi di New York tahun 1999, isolat tersebut memiliki kedekatan dengan virus *lineage* 1a yang diisolasi di Israel tahun 1998 (Petersen et al. 2013; Chancey et al. 2015). Hal tersebut menimbulkan persepsi bahwa virus WN NY99 mungkin disebarkan melalui burung migrasi atau vektor yang tidak sengaja terbawa turis yang sebelumnya mengunjungi negara Israel. *Clade* 1a kemudian dibagi menjadi *subclade* A dan B. Sebagian besar isolat dari Eropa Barat dan beberapa isolat dari Eropa Timur masuk ke dalam *subclade* A sedangkan sisa isolat lain dari Eropa Timur masuk kedalam *subclade* B (Zehender et al. 2017). *Clade* 1b terdiri dari virus Kunjin asal Australia yang merupakan salah satu subtype dari WNV. *Clade* 1c terbatas pada isolat dari India dan kemudian membentuk kluster baru menjadi *lineage* 5 (Martín-Acebes 2012; Pachler et al. 2014; Chancey et al. 2015).

Isolat virus WN *lineage* 2 secara historis ditemukan endemis di Sub Sahara Afrika dan Madagaskar. Isolat ini telah menyebabkan wabah zoonosis yang bersifat sporadik di Afrika Selatan meskipun dianggap kurang virulen jika dibandingkan dengan *lineage* 1. Selanjutnya, wabah oleh *lineage* 2 pada manusia dan burung terjadi di Eropa, khususnya Eropa Selatan dan Eropa Timur. Virus *West Nile lineage* 2 juga ditemukan di Indonesia pada spesimen kasus klinis pada tahun 2004 melalui sekuensing (Martín-Acebes 2012; Myint et al. 2014; Chancey et al. 2015).

Lineage 3 berhasil diisolasi dari isolat nyamuk *Culex* asal Republik Ceko yang berdekatan dengan Austria, pada tahun 1997 dan 1999. *Lineage* 3 secara eksperimental hanya mampu menginfeksi nyamuk dan sel-selnya lebih lanjut WNV *lineage* 4 diisolasi dari kutu *Dermacentor marginatus* di Rusia pada tahun 1988, termasuk isolat kutu dari Caucasus dan beberapa isolat nyamuk dan reptil di sungai Volga. *Lineage putative* 6 yang memiliki kedekatan dengan *lineage* 4 pernah dilaporkan di Spanyol. Beberapa isolat lain yang pernah ditemukan yaitu virus Koutanyo dari Afrika (KOUNV) yang merupakan *lineage putative* 7 dan *lineage putative* 8 yang merupakan varian virus Kunjin (KUNV) pada isolat asal Serawak dan Senegal (Martín-Acebes 2012; Pachler et al. 2014; Chancey et al. 2015).

MUTASI

Virus RNA dapat beradaptasi secara cepat terhadap perubahan lingkungan dan dikenal memiliki angka mutasi yang tinggi dengan kemampuan evolusi yang cepat. Perubahan kecil dari nukleotida/asam amino dapat mempengaruhi replikasi dan virulensi virus serta spesifisitas inang (Ebel et al. 2004). Terjadinya mutasi selektif dapat menghasilkan profil epidemiologi dan gambaran penyakit yang tidak terduga. Mutasi pada WNV dapat terjadi baik pada protein struktural maupun protein non-struktural dan menghasilkan atenuasi fenotip (Brault et al. 2007; Pachler et al. 2014). Perubahan pada 5' dan 3' Untranslated Region (UTR) juga dianggap berpengaruh dalam patogenitas WNV (Pachler et al. 2014). Meskipun genom WNV relatif fleksibel terhadap beberapa perubahan sekuen yang dapat mempengaruhi patogenitas virus, namun hal tersebut tergantung dari strain virus dan kepekaan inang terinfeksi (Rizzoli et al. 2015).

Protein struktural dan non-struktural WNV berperan dalam berbagai fungsi seperti replikasi, virulensi dan patogenitas (Tan et al. 2009; Chancey et al. 2015). Perubahan atau mutasi yang terjadi baik pada protein struktural dan non-struktural dapat dimanfaatkan untuk penemuan vaksin karena beberapa mutasi bersifat menguntungkan. Beberapa penelitian modifikasi genetik protein struktural dan non-struktural WNV pun dilakukan untuk mendapatkan antiviral atau vaksin yang berpotensi.

Pada protein struktural PrM, substitusi asam amino T20 menjadi asam aspartat dapat mempengaruhi glycosylation, pembentukan heterodimer dan sekresi partikel virus (Lustig et al. 2018). Mutasi pada protein PrM (K31A, K31T, K31V, T20D) menyebabkan penurunan sekresi antigen VLP secara signifikan dari sel yang ditransfeksikan (Calvert et al. 2012). Tan et al. (2009) menyatakan bahwa triple mutasi pada ektodomain protein PrM menyebabkan hilangnya infeksi WNV pada sel mamalia dan nyamuk secara nyata. Selain itu, mutasi protein PrM N15Q menyebabkan terjadinya penurunan jumlah virus jika dibandingkan dengan *wild-type* WNV melalui uji real-time PCR (Hanna et al. 2005).

Mutasi protein struktural lainnya terjadi pada glikoprotein E. Substitusi tunggal asam amino T70I bertanggungjawab dalam peningkatan resistensi asam yang menjadikan mutan membutuhkan pH lebih asam di dalam endosome untuk melakukan fusi. Sedangkan perubahan tunggal asam amino pada glikoprotein E posisi 159 menyebabkan replikasi dan transmisibilitas virus terjadi secara efisien pada suhu yang lebih tinggi oleh vektor (Martin-Acebes & Saiz 2011), sehingga mutasi glikoprotein E yang terjadi pada Val 159 Ala dianggap dapat mempengaruhi adaptasi virus terhadap

vektor nyamuk *Culex* sp (Di Giallonardo et al. 2016). Adaptasi tersebut dapat menghasilkan vektor yang kompeten dalam peningkatan distribusi dan intensitas penularan WNV pada inang. Perubahan genetik pada motif N-glycosylation protein E menyebabkan hilangnya situs N-glycosylation, tidak stabilnya fusi E-peptide dan penurunan replikasi virus (Rizzoli et al. 2015). Mutasi pada protein E L107E yang terletak pada daerah *conserved fusion loop flavivirus* menyebabkan atenuasi *neuroinvasive* pada mencit meskipun tidak menyebabkan atenuasi *neurovirulen* secara signifikan. Sedangkan mutasi N154S menyebabkan atenuasi moderate *neuroinvasive* dan atenuasi ringan *neurovirulen* (Beasley et al. 2005; Zhang et al. 2006; Whiteman et al. 2010).

Mutasi pada asam amino P250L protein NS1 bertanggungjawab terhadap atenuasi WNV *lineage 2* secara signifikan pada hewan coba mamalia baik secara *in vivo* dan *in vitro*. Mutasi pada NS1 dianggap menjadi ciri khas yang penting dari virulensi WNV *lineage 2* (Szentpáli-Gavallér et al. 2016). Virus yang memiliki mutasi NS1 NNT130-132QQA/N175A/N207A mampu menghapus 3 situs *glycosylation* pada protein NS1 WNV dan menghasilkan atenuasi virus pada tikus secara *neuroinvasive* dan *neurovirulen*. Infeksi dengan virus mutan tersebut dapat menginduksi terbentuknya antibodi protektif yang mampu melindungi 50% mencit dari infeksi letal dengan WNV 99NY. Secara *in vitro*, mutasi yang terjadi akibat rendahnya *glycosylation* NS1 tersebut menyebabkan replikasi, maturasi dan sekresi NS1 dari retikulum endoplasmik tidak terjadi secara efektif pada sel Vero (Liu et al. 2006; Whiteman et al. 2015). Mutasi pada residu T260A-G270S protein NS2A menyebabkan pembentukan vesikel yang abnormal, oleh karena itu protein NS2A dianggap berperan langsung dalam pembentukan vesikel. Perubahan genetik protein NS2A pada A30P menyebabkan hilangnya NS1' (NS1 *extension*) dan terganggunya mekanisme penghindaran respon imun inang. Mutasi A30P pada NS2A menghasilkan sifat atenuasi berkaitan dengan hilangnya kemampuan virus untuk menghambat aktivitas INF- β *transcription*, sehingga terjadi penurunan penyebaran virus secara signifikan akibat induksi respon INF- β yang kuat. Pada hewan coba, mutasi ini membatasi kemampuan replikasi virus ekstra neural sehingga dapat menurunkan kemungkinan virus menyerang sistem saraf pusat yang menyebabkan *encephalitis* (Liu et al. 2006; Rizzoli et al. 2015). Mutasi pada protein NS2A beserta NS4A menghasilkan kegagalan replikasi virus RNA dan menyebabkan pembentukan vesikel yang *immature* (Yu et al. 2017). Mutasi yang terjadi pada protein NS3 posisi H249P dan protein NS4B posisi E249B menghasilkan penurunan virulensi pada mencit secara parsial (Szentpáli-Gavallér et al. 2016).

Substitusi asam amino T249P pada protein NS3 berkontribusi terhadap peningkatan virulensi pada unggas secara signifikan (Brault et al. 2007). Pada burung gagak Amerika (*Corvus brachyrhynchos*) mutasi ini menyebabkan peningkatan virogenesis dan efisiensi replikasi pada suhu tinggi (Rizzoli et al. 2015). Mutasi pada NS3del483 dianggap dapat menyebabkan atenuasi virus berkaitan dengan penurunan efisiensi replikasi secara *in vivo* pada hewan coba tikus dan secara *in vitro* pada sel tikus L929. Delesi residu Asp483 terdapat di dalam domain RNA helicase dan sangat *conserved* pada WNV, sehingga dianggap sebagai determinan penting sifat *neuroinvasive* dan *neurovirulen* WNV. Virus West Nile dengan mutasi NS3del483 lebih mudah dieliminasi dari sirkulasi dan kurang bersifat *neuroinvasive* jika dibandingkan dengan virus *wild type*. Delesi residu Asp483 menyebabkan virus lebih peka terhadap obat antiviral sehingga produksi virus dapat ditekan. Penurunan produksi virus menyebabkan infeksi virus pada hewan dapat lebih mudah dikontrol dan menghasilkan atenuasi dari *quasispecies* secara parsial (Ebel et al. 2011).

Mutasi pada NS4A E46K, E47K dan D50K menyebabkan peningkatan degradasi ATP oleh NS3. Berkaitan dengan fungsi ATP *in vitro* yang dibutuhkan untuk aktivitas NS3 helicase, mutasi pada NS4A dapat menjadi target mutagenesis untuk mendapatkan profil atenuasi WNV melalui perubahan efisiensi replikasi virus (Shiryaev et al. 2009). Mutasi titik pada protein NS4A (V67I) dan NS4B (I240M) memberikan kemampuan WNV untuk menginduksi jalur autofagi (Blazquez et al. 2015). Mutasi protein NS4B pada C102S, P38G dan E249G mampu mengurangi hambatan signaling IFN, menurunkan aktivitas helicase dan replikasi virus. Mutasi NS4B E249G mampu menurunkan mortalitas hingga 50%, menurunkan patogenitas dan meningkatkan imunogenisitas pada mencit. Mutasi P38G berlokasi di *regio conserved* dari NS4B dekat dengan *N-Terminal domain*, sedangkan mutasi pada C102S berlokasi di sentral domain transmembran hidrofobik. Mutasi P38G dan C102S adalah mutasi yang menghasilkan sifat atenuasi yang kuat. Mutasi C102S menyebabkan atenuasi pada *neuroinvasive* dan *neurovirulen*, sedangkan mutasi P38G menyebabkan atenuasi pada *neuroinvasive* namun tidak pada *neurovirulen* (Wicker et al. 2006; Evans & Seeger 2007; Wicker et al. 2012; Rizzoli et al. 2015). Substitusi Val-Met pada asam amino posisi 9 peptida 2K (yang mencakup membran retikulum di antara protein NS4A dan NS4B) memberikan sifat resistensi WNV terhadap obat antiviral lycorine melalui peningkatan replikasi RNA virus (Evans & Seeger 2007; Zou et al. 2009). Berkaitan dengan sifat protein NS4B yang penting untuk replikasi dan penentuan patogenitas virus pada inang melalui

hambatan STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) ketika *signalling* interferon, maka mutasi pada NS4B dapat dimanfaatkan sebagai target antiviral yang poten di masa mendatang (Wicker et al. 2006; Wicker et al. 2012). Mutasi pada protein NS5 (VI631/632AA, W651A, W382A) menyebabkan hambatan signaling IFN dan mempengaruhi virulensi WNV asal lapangan (Laurent-Rolle et al. 2010). Mutasi pada NS5 K61A, K182A dan E218A menyebabkan hilangnya aktivitas 2'O metilasi yang menghasilkan atenuasi pada WNV. Mutasi NS5 E218A memungkinkan WNV mengalami atenuasi pada fenotip *neuroinvasive* dan *neurovirulen* serta dapat menginduksi respon imun yang protektif (Zhou et al. 2007). Kombinasi mutasi secara alami protein NS5 (A804V) bersama dengan protein NS4B (E249G) dan 3'UTR (A10596G, C10774U, A10799G) menghasilkan varian virus dengan *small plaque* (sp), *temperature sensitive* (ts) dan atenuasi pada tikus (Davis et al. 2007).

Beberapa mutasi dimanfaatkan untuk penelitian vaksin di masa mendatang karena bersifat menguntungkan dengan menurunkan infektivitas, replikasi, patogenitas dan virulensi virus. Sehingga diharapkan ke depan dapat dikembangkan vaksin untuk manusia dengan efikasi yang baik dan aman melalui modifikasi genetik WNV.

PERKEMBANGAN OBAT ANTIVIRAL

Obat antiviral adalah salah satu strategi yang digunakan untuk mengendalikan infeksi virus ketika vaksin yang sesuai belum ditemukan. Terapi antiviral yang efektif memiliki target pada protein inang atau virus yang berperan penting dalam infeksi dan replikasi seperti protein NS3, NS4B dan NS5. Namun usaha penemuan obat antiviral untuk infeksi WNV masih cukup rendah jika dibandingkan dengan virus Hepatitis C dan Dengue. Hal tersebut berkaitan dengan persepsi rendahnya urgensi infeksi WNV pada manusia yang cenderung asimtomatis. Selain menggunakan alternative terapi dengan antibodi, terapi WNV akan dijelaskan lebih dalam menurut mekanisme penghambatan replikasi dan penurunan infektivitas virus.

Berkaitan dengan reaksi silang di antara flavivirus, pengembangan obat Dengue mungkin berpotensi digunakan sebagai terapi WNV. Alternatif terapi lain dapat dilakukan dengan pemberian antibodi. Antibodi melindungi inang dari infeksi WNV melalui beberapa mekanisme seperti blokade reseptor binding, hambatan fusi, pembersihan virus, lisis virus/sel terinfeksi dan sitotoksitas sel terinfeksi (Lim & Shi 2013). Molekul seperti interferon- α dianggap memiliki aktivitas proteksi terhadap infeksi WNV secara *in vitro* dan *in vivo* dengan menghambat tropisme virus dan

mencegah kematian sel neuron terinfeksi. Meskipun molekul tersebut tidak dapat melintasi *blood brain barrier* namun interferon- α bisa menjadi terapi yang berpotensi untuk flaviviral encephalitis (Gea-Banacloche et al. 2004; Samuel & Diamond 2005). Penggunaan interferon- α pada 2 orang pasien dengan infeksi WNV encephalitis dilaporkan pertama kali pada tahun 2005 dengan hasil pemulihan kondisi pasien setelah periode recovery selama 9 bulan (Kalil et al. 2005). Dibandingkan dengan ribavirin, interferon- α memiliki aktivitas terapeutik yang lebih baik (Anderson & Rahal 2002).

Ribavirin dianggap mampu menghambat replikasi dan sitopatogenisitas WNV pada sel saraf manusia secara *in vitro*. Pada sel vero, penggunaan ribavirin hanya menghasilkan sifat protektif tanpa diikuti dengan sifat terapeutik (Anderson & Rahal 2002). Ribavirin dengan dosis tinggi dapat meningkatkan prognosis pada individu dengan kondisi *encephalitis* (Jordan et al. 2000; Gould & Fikrig 2004). Beberapa laporan menyatakan bahwa penggunaan ribavirin pada hewan coba dan pasien wabah di Israel menunjukkan hasil yang kurang baik (Chowers et al. 2001; Morrey et al. 2004). Favipiravir merupakan analog nukleosida berspektrum luas dengan aktivitas antiviral yang poten terhadap beberapa virus RNA. Secara eksperimental, favipiravir mampu melindungi mencit dari ujiantang WNV dosis letal. Aktivitas poten tersebut didapatkan dari kemampuan obat ini dalam menurunkan infektivitas virus dan mengurangi jumlah virus (Escribano-Romero et al. 2017).

Pengobatan infeksi WNV dengan SiRNA dianggap efektif untuk menghentikan replikasi virus. Salah satu contohnya adalah penggunaan bifungsional SiRNA yang terbukti mampu menurunkan titer WNV. Efektivitas efikasi SiRNA sebagai terapi antiviral dicapai setelah 48 jam infeksi secara *in vitro*. SiRNA yang memiliki target pada protein NS5 dan NS2A dapat menjadi kandidat terapi antiviral WNV di masa mendatang (Karothis et al. 2018). Secara *in vivo*, penggunaan SiRNA dapat menurunkan titer virus di otak, menurunkan neuropatologi dan mortalitas serta menghasilkan angka *recovery* setelah 5-6 hari infeksi. SiRNA menghasilkan respon imunitas alami yang memberikan perlindungan dan *recovery* terhadap infeksi *flavivirus encephalitis* (Bloor et al. 2018).

Beberapa obat Parkinson seperti L-Dopa, Selegiline, Isatin dan Amantadine pernah diuji sebagai obat WNV. Pengobatan dengan L-Dopa, Isatin dan Amantadine mampu menurunkan jumlah virus secara signifikan secara *in vitro*. Di antara obat antiparkinson tersebut, hanya amantadine yang memiliki efek penghambatan infeksi WNV tertinggi dengan mekanisme hambatan multiplikasi pada tahap maturasi (Blázquez et al. 2016). Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, pengembangan lebih lanjut obat

Parkinson sebagai terapi infeksi WNV yang poten perlu dilakukan untuk melihat efikasi obat secara klinis baik pada hewan maupun manusia.

Inhibitor Protein Kinase C (PKC) seperti Chelerythrine dan Calphostin C dapat menjadi kandidat antivirus yang potensial untuk pengobatan infeksi WNV. Chelerythrine dan Calphostin C mampu menginduksi penurunan multiplikasi WNV secara signifikan pada percobaan *in vitro*. Chelerythrine bekerja pada regio katalitik C-terminal yang conserved sehingga chelerythrine mampu menghambat semua bentuk isoform PKC. Calphostin C berinteraksi dengan *N-Terminal regulatory* dari PKC dan berkompetisi untuk terikat pada *binding site* DAG (diacylglycerol) dan phorbol esters sehingga calphostin C menjadi inhibitor yang lebih spesifik untuk PKC klasik dan novel namun tidak untuk PKC dalam bentuk atipikal (Blázquez et al. 2016; Blázquez et al. 2018). Thiopurine dianggap mampu menghambat replikasi sebagian besar virus dari famili *flaviviridae* termasuk menghambat produksi WNV (Lim et al. 2011).

Minocyclin merupakan antibiotik tetrasiklin yang mampu menghambat replikasi WNV dan apoptosis sel saraf manusia melalui hambatan *signaling c-Jun N terminal kinase* (JNK) secara *in vitro*. Minocyclin yang memiliki sifat neuroprotektif menjadi senyawa antiviral dan antiinflamasi untuk terapi *encephalitis* yang disebabkan oleh virus. Berkaitan dengan sifatnya yang aman dan murah, minocycline dapat menjadi kandidat terapi antiviral WNV untuk dikembangkan lebih lanjut di masa mendatang (Michaelis et al. 2007). Lycorine merupakan senyawa alkaloid dengan efek biologis menghambat sintesis protein dan DNA serta menghambat pertumbuhan dan pembelahan sel. Lycorine dilaporkan memiliki aktivitas antiviral melalui penekanan replikasi RNA virus (Zou et al. 2009).

Kombinasi *alcohol monoterpene* (CMA) yang didapatkan dari *Melaleuca alternifolia* menghasilkan aktivitas virusidal, penurunan titer virus dan presentasi sel terinfeksi secara *in vitro*. Aktivitas tersebut didapatkan dari mekanisme induksi siklus sel pada fase G0/G1. Sedangkan secara *in vivo*, CMA menyebabkan penurunan morbiditas, hambatan penurunan berat badan dan penurunan titer virus di otak (Pliego Zamora et al. 2016). Molekul oligomer *antisense* mampu menghambat virus dengan mekanisme pengikatan RNA pada sekuen spesifik. Molekul seperti *phosphorodiamidate morpholino oligomer* (PMO) memiliki aktivitas inhibitor pada beberapa *flavivirus* termasuk WNV secara *in vitro* dan *in vivo*. Efikasi PMO secara *in vivo* terhadap infeksi WNV membutuhkan konjugasi dengan *peptide Arg-rich* (PPMO). Penggunaan PPMO sebagai sebagai terapi antiviral WNV dicapai dengan dosis 100-200 ug/hari yang menghasilkan perlindungan pada hewan coba

tikus secara parsial dari infeksi WNV, sedangkan dosis 300 ug/hari PPMO dapat menimbulkan toksisitas pada hewan coba (Diamond 2005; Deas et al. 2007).

Derivat imino sugar seperti deoxynorjirimycin (DNJ) atau castanospermine memiliki aktivitas antiviral dengan mekanisme hambatan pada retikulum endoplasmik α -glukosidase 1 dan 2 pada inang yang esensial untuk sekresi virus (Diamond 2009). Derivate DNJ dengan rantai samping *hydroxylated cyclohexyl* yaitu OSL-95II juga memiliki aktivitas antiviral terhadap WNV dengan mekanisme hambatan yang sama, kemudian *novel derivate imino sugar* CM-9-78 yang memiliki atom oksigen dalam rantai samping memiliki efikasi antiviral yang lebih baik jika dibandingkan dengan OSL-95II (Chang et al. 2009).

Metabolisme *lipid* berkaitan erat dengan infeksi *flavivirus* karena kolesterol terlibat dalam infektivitas WNV. Terapi dengan lovastatin dapat menghentikan infeksi secara *in vitro*. Penambahan lovastatin dan kolesterol eksogen pada media kultur mampu menurunkan replikasi replikon WNV hingga 89%. Efek lain yang dihasilkan adalah penurunan replikasi virus, produksi virus yang infeksius dan pembentukan struktur membran yang diinduksi virus pada sel yang diinfeksi WNV. Terapi dengan lovastatin dan kolesterol pada pasien yang terinfeksi WNV dapat menjadi pilihan yang aman dan murah untuk uji klinis di masa mendatang (Mackenzie et al. 2007).

Tahap replikasi RNA WNV sangat bergantung dari proses sintesis asam lemak dengan bantuan enzim kunci asam lemak sintase. Pemberian *inhibitor* enzim asam lemak sintase yaitu cerulenin dan C75 dianggap mampu menurunkan infeksi seluler WNV secara *in vitro*. Cerulenin dan C75 mampu menurunkan produksi WNV ketika ditambahkan ke media kultur pada 0 atau 3 jam setelah infeksi, hal tersebut menunjukkan bahwa cerulenin dan C75 memiliki pengaruh pada stadium replikasi virus dibandingkan dengan tahap *viral entry*. Hambatan produksi virus pada 3 jam setelah infeksi dicapai dengan penurunan sintesis RNA virus (Martín-Acebes et al. 2011).

Asam mikofenolik merupakan *inhibitor* yang poten untuk WNV dengan mekanisme hambatan enzim inosine monophosphate dehydrogenase. Brequinar yang merupakan *inhibitor* enzim dihydroorotate dehydrogenase, enzim kunci dalam biosintesis pirimidin *de novo*, dapat menghambat sintesis RNA virus, perakitan dan pelepasan virion secara *in vitro* (Qing et al. 2010). Senyawa 6-azauridin merupakan *inhibitor* enzim orotidine monophosphate decarboxylase, enzim yang berperan dalam biosintesis pirimidin, mampu mengontrol infeksi WNV dengan mekanisme hambatan replikasi virus secara *in vitro*. Cyclosporine yang merupakan isomerase peptidyl-prolyl bekerja dengan mengganggu interaksi antara NS5 dan cyclophilin A yang dibutuhkan virus untuk

menginfeksi inang (Qing et al. 2009; Krishnan & Garcia-Blanco 2014). Pengembangan terapi antiviral yang memiliki target pada komponen utama metabolisme nukleotida dapat menjadi terapi antiviral untuk WNV yang menjanjikan di masa mendatang. Pengembangan obat antiviral terus dilakukan khususnya untuk terapi pasien dengan gangguan sistem kekebalan tubuh dan jika vaksin yang sesuai belum dihasilkan.

PERKEMBANGAN VAKSIN

Salah satu tindakan pencegahan terhadap infeksi virus adalah dengan melakukan vaksinasi. Vaksinasi dapat menjadi program eradikasi yang baik jika dikombinasikan dengan metode pengendalian lain. Beberapa sifat vaksin yang ideal memiliki sifat poten dan stabil, dosis tunggal, tidak menyebabkan efek samping yang berlebihan serta antibodi yang terbentuk dapat dibedakan dengan antibodi dari infeksi alam (Peyre et al. 2009).

Berbagai kandidat vaksin WNV masih dalam tahap pengujian. Vaksin terlisensi saat ini hanya tersedia untuk kuda, sedangkan vaksin untuk manusia seperti vaksin VLA (*live attenuated*), DNA dan platform lainnya masih dalam tahap pengembangan (Gould & Fikrig 2004). Terdapat 4 jenis vaksin untuk kuda yang tersedia di pasaran yaitu tiga vaksin inaktif utuh dan satu vaksin *live chimera* Canarypox yang mengekspresikan protein PrM dan E dari WNV (Barrett 2018). Keseluruhan vaksin tersebut membutuhkan dosis ganda pada awal pemberian dengan *booster* yang berulang setiap tahun (Kaiser & Barrett 2019).

Perkembangan vaksin WNV pada manusia masih terus berlanjut, hingga saat ini terdapat 6 buah kandidat vaksin WNV yang masih dalam tahap uji klinis. Kandidat vaksin tersebut diantaranya Hydrovax-001, *Inactivated* WNV, Chimerivax-WN02, rWN/DEN4del30, HBV-002 atau WN-80E dan VRC WNV (Ulbert 2019).

Kandidat vaksin Hydrovax-001 merupakan vaksin inaktif dengan virus utuh yang berbasis hidrogen peroksida. Kandidat vaksin ini masih dalam tahap I uji klinis pada manusia dan membutuhkan uji klinis lanjutan untuk mengetahui kemampuan imunogenitasnya. Berbeda dengan kandidat vaksin lain yang menggunakan *strain* WNV NY99, Hydrovax-001 menggunakan *strain* virus Kunjin yang telah teratenuasi secara alami. Respon antibodi dihasilkan dengan pemberian dosis berganda dari kandidat vaksin ini (Woods et al. 2019). Kandidat vaksin inaktif WNV NY99 merupakan kandidat vaksin yang telah melalui tahap uji I/II secara klinis. Kandidat vaksin ini menggunakan *strain* WNV NY99 yang berbasis

formaldehid dan berhasil menimbulkan respon imun tertinggi setelah pemberian 3 dosis (Barrett et al. 2017).

Kandidat vaksin *chimera* WNV ChimeriVax-WN02 merupakan virus *Yellow Fever* 17-D yang mengekspresikan protein PrM dan E dari WNV NY99. Kandidat vaksin ini merupakan generasi kedua dari ChimeriVax-WN dengan 3 mutasi protein E pada residu 107, 316 dan 440 yang menghasilkan peningkatan atenuasi (Arroyo et al. 2004). Vaksin ChimeriVax-WN02 mampu meningkatkan respon imun humoral pada hamster. Pada kera, vaksin ini menyebabkan viremia sementara, menginduksi antibodi tetralisasi dan melindungi dari virusantang West Nile *wild type* yang diinfeksi secara intraserebral. Vaksin chimera dapat menginduksi sel CD4+ dan CD8+ terhadap infeksi WNV pada manusia. Puncak respon antibodi diperoleh dengan dosis tunggal. Berdasarkan uji klinis fase II, kandidat vaksin ini dianggap aman dan efektif pada manusia dengan kelompok umur yang bervariasi (Monath et al. 2015; Kaiser & Barrett 2019).

Kandidat vaksin *chimera live attenuated* WNV/Dengue serotype 4 (WN/DEN4) menghasilkan respon antibodi netralisasi yang kuat dan melindungi kera dari viremia ketika dilakukan uji tantang. Vaksin ini merupakan virus *chimera* yang mendapat gen protein struktural PrM dan E dari WNV strain NY99 (Gould & Fikrig 2004). Sedangkan kandidat vaksin *chimera* rWN/DEN4delta30 merupakan vaksin *chimera* WN/DEN4 yang didapat dari 2 mekanisme yaitu chimerisasi antigenik WNV dengan non-neuroinvasive virus dengue serotipe 4 dan delesi 30 nukleotida pada 3'UTR (Pierce et al. 2017). Baik vaksin *chimera* WN/DEN4 dan rWN/DEN4delta30 dengan dosis tunggal 103 FFU menghasilkan perlindungan sebesar 90-100% ketika ditantang dengan WNV. Sedangkan dosis yang lebih tinggi (104 FFU) dari kedua vaksin chimera tersebut menghasilkan perlindungan yang lengkap terhadap uji tantang WNV (Pletnev et al. 2002). Berdasarkan uji klinis fase I, kandidat vaksin ini dianggap menjanjikan dari segi keamanan dan imunogenisitasnya (Kaiser & Barrett 2019).

Kandidat vaksin lain adalah WN-80E atau HBV-002 yang dibuat berdasarkan protein E terlarut yang tidak memiliki domain transmembran pada sistem ekspresi dalam sel *Drosophila melanogaster* dengan atau tanpa pemberian protein NS1 WNV. Vaksin ini terbukti dapat menginduksi antibodi pada beberapa hewan coba seperti hamster dan *non-human primates*. Pada uji klinis tahap I, netralisasi antibodi dicapai setelah minggu ke-2 post vaksinasi. Kandidat vaksin ini memiliki efektivitas dan imunogenisitas yang rendah pada pasien diatas umur 45 tahun (Watts et al. 2007; Siirin et al. 2008; Brandler & Tangy 2013; Kaiser & Barrett 2019).

Kandidat vaksin VRC-WNV merupakan kandidat vaksin dengan plasmid DNA yang mengekspresikan fragmen protein PrM/E WNV. Kandidat vaksin ini terdiri dari CMV-302 dan CMV 303. Kandidat CMV 302 menggunakan promotor Cytomegalovirus untuk meningkatkan ekspresi gen, sedangkan kandidat CMV 303 menggunakan promotor Human T-cell Leukemia virus Tipe 1 untuk ekspresi gen lebih lanjut. Berdasarkan uji klinis fase I, kandidat vaksin ini menghasilkan netralisasi antibodi (> 90%) yang dicapai setelah tiga kali pemberian dosis pada kelompok usia pasien yang berbeda (Kaiser & Barrett 2019).

Kandidat vaksin lainnya yang masih dalam tahap pengembangan adalah vaksin rekombinan subunit. *WNV-like particle* dikembangkan pada sel insekta dengan menggunakan rekombinan Baculovirus yang mengekspresikan protein struktural PrM/E atau C/PrM/E WNV. Vaksin tersebut terbukti dapat menurunkan morbiditas dan mortalitas pada mencit setelah dilakukan uji tantang dengan WNV. Imunitas terhadap WNV dihasilkan tanpa disertai dengan viremia (Qiao et al. 2004). Kandidat vaksin rekombinan yang mengandung domain III protein E WNV pada vektor ekspresi *E. coli* mampu meningkatkan produksi antibodi dan menghasilkan imunitas yang protektif terhadap infeksi WNV dan encephalitis pada mencit (Chu et al. 2007). Kandidat vaksin rekombinan yang menggunakan virus Measles (MV) *strain* Schwars (MVSchw-sEWNV) mampu mengekspresikan protein E WNV strain virulen IS-98-ST1. Vaksin ini menghasilkan perlindungan pada mencit dari uji tantang dosis letal WNV dan mampu menghasilkan antibodi spesifik terhadap WNV (Desprès et al. 2005). Kandidat vaksin rekombinan lain (TRIP/sEWNVe) menggunakan vektor Lentivirus yang mengekspresikan protein E/PrM dari WNV strain virulen IS-98-ST1. Kandidat vaksin ini berhasil memberikan perlindungan mencit terhadap uji tantang WNV dengan dosis letal dan berhasil meningkatkan imunitas yang protektif dan tahan lama dengan dosis tunggal (Iglesias et al. 2006).

Pengembangan vaksin *chimera live attenuated* lainnya menggunakan virus JE strain SA14-14-2 sebagai *genetic backbone* yang mengekspresikan gen PrM dan E dari WNV (ChinWNV). ChinWNV menghasilkan replikasi yang efisien pada sel vero, stabilitas genetik secara *in vitro* dan profil atenuasi secara *in vivo* pada mencit. Dosis tinggi ChinWNV menghasilkan respon imun humoral yang kuat dan segera pada mencit sehingga menghasilkan perlindungan yang baik dari virusantang West Nile yang bersifat letal (Li et al. 2013). Sedangkan pengembangan vaksin dengan virus subtype WNV-Kunjin berbasis virus DNA mampu memberikan perlindungan pada mencit terhadap uji tantang dengan

dosis letal WNV (Hall et al. 2003; Brandler & Tangy 2013).

PROSPEKTIF PENELITIAN WEST NILE VIRUS

Kasus infeksi WNV telah dideteksi di Indonesia pada tahun 2014, namun data penunjang penelitian masih sangat terbatas. Beberapa penelitian yang dilakukan di Indonesia masih difokuskan pada kejadian wabah asal manusia. Surveilans dan monitoring virus ini baik pada vektor (nyamuk), *reservoir* (burung), manusia dan hewan lain seperti kuda sangat diperlukan untuk melihat perkembangan virus ini di lapangan mengingat WNV memiliki diversifitas yang tinggi, variasi fenotip yang luar biasa, sirkulasi endemis di beberapa negara di dunia dan kemampuan mutasi yang mungkin dapat menyebabkan wabah suatu saat nanti (Rizzoli et al. 2015).

Kondisi negara Indonesia yang memiliki iklim tropis sangat mendukung perkembangbiakan vektor WNV (nyamuk) (Bartlow et al. 2019). Kedekatan antara *reservoir*-vektor-inang insidental menjadi tantangan dalam pengendalian penyakit ini di Indonesia. Selain itu, peningkatan populasi vektor dihubungkan dengan peningkatan resistensi produk insektisida yang digunakan untuk mengendalikan populasi nyamuk. Kesenjangan pengetahuan mengenai aspek penting dari virus, disertai dengan belum tersedianya vaksin dan pengobatan khusus untuk manusia membatasi kemampuan dalam memprediksi, mencegah dan mengendalikan infeksi WNV di Indonesia. Penelitian lanjutan sangat diperlukan untuk memonitoring perkembangan virus ini di lapangan serta sebagai upaya untuk penemuan vaksin dan antiviral untuk infeksi WNV di masa mendatang.

KESIMPULAN

Karakterisasi biologi protein struktural dan non-struktural virus West Nile perlu dilakukan secara berkesinambungan untuk dapat memprediksi, mencegah dan mengendalikan infeksi virus West Nile baik pada vektor, hewan peka dan manusia. Kejadian mutasi pada protein struktural dan non-struktural dapat menyebabkan peningkatan efisiensi penularan virus West Nile, namun beberapa mutasi bersifat menguntungkan dan menghasilkan atenuasi virus yang dimanfaatkan dalam pengembangan vaksin west Nile virus di masa mendatang. Pengembangan obat antiviral terus dilakukan khususnya untuk terapi pasien dengan gangguan sistem kekebalan tubuh dan jika vaksin yang sesuai belum dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alcalá AC, Hernández-Bravo R, Medina F, Coll DS, Zambrano JL, del Angel RM, Ludert JE. 2017. The dengue virus non-structural protein 1 (NS1) is secreted from infected mosquito cells via a non-classical caveolin-1-dependent pathway. *J Gen Virol.* 98:2088-2099.
- Alcalá AC, Palomares LA, Ludert JE. 2018. Secretion of nonstructural protein 1 of dengue virus from infected mosquito cells: facts and speculations. *J Virol.* 92:e00275-18.
- Anderson JF, Rahal JJ. 2002. Efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virus in vitro. *Emerg Infect Dis.* 8:107-108.
- Armstrong PM, Vossbrinck CR, Andreadis TG, Anderson JF, Pesko KN, Newman RM, Lennon NJ, Birren BW, Ebel GD, Henn MR. 2011. Molecular evolution of West Nile virus in a northern temperate region: Connecticut, USA 1999–2008. *Virol.* 417:203-210.
- Arroyo J, Miller C, Catalan J, Myers GA, Ratterree MS, Trent DW, Monath TP. 2004. ChimeriVax-West Nile Virus live-attenuated vaccine: preclinical evaluation of safety, immunogenicity and efficacy. *J Virol.* 78:12497-12507.
- Barrett ADT. 2018. West Nile in Europe: an increasing public health problem. *J Travel Med.* 25:1-2.
- Barrett PN, Terpening SJ, Snow D, Cobb RR, Kistner O. 2017. Vero cell technology for rapid development of inactivated whole virus vaccines for emerging viral diseases. *Expert Rev Vacc.* 16:883-894.
- Bartlow AW, Manore C, Xu C, Kaufeld KA, Del Valle S, Ziemann A, Fairchild G, Fair JM. 2019. Forecasting zoonotic infectious disease response to climate change: mosquito vectors and a changing environment. *Vet Sci.* 6:40.
- Beasley DWC, Barrett ADT. 2002. Identification of neutralizing epitopes within structural domain iii of the west nile virus envelope protein. *J Virol.* 76:13097–13100.
- Beasley DWC, Whiteman MC, Zhang S, Huang CY-H, Schneider BS, Smith DR, Gromowski GD, Higgs S, Kinney RM, Barrett ADT. 2005. Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 west nile virus strains. *J Virol.* 79:8339-8347.
- Beloor J, Maes N, Ullah I, Uchil P, Jackson A, Fikrig E, Lee SK, Kumar P. 2018. Small interfering rna-mediated control of virus replication in the cns is therapeutic and enables natural immunity to west nile virus. *Cell Host Microbe.* 23:549-556.
- Bhuvanathan R, Chong MK, Ng ML. 2009. Specific interaction of capsid protein and importin- α/β influences West Nile virus production. *Biochem Biophys Res Commun.* 389:63-69.
- Blázquez AB, Martín-Acebes MA, Saiz J-C. 2016. Inhibition of west nile virus multiplication in cell culture by anti-parkinsonian drugs. *Front Microbiol.* 7:296.

- Blázquez AB, Martín-Acebes MA, Saiz JC. 2015. Amino acid substitutions in the non-structural proteins 4A or 4B modulate the induction of autophagy in West Nile virus infected cells independently of the activation of the unfolded protein response. *Front Microbiol.* 5:1-9.
- Blázquez AB, Vázquez-Calvo Á, Martín-Acebes MA, Saiz JC. 2018. Pharmacological inhibition of protein kinase c reduces West Nile virus replication. *Viruses.* 10:91. doi: 10.3390/v10020091.
- Brandler S, Tangy F. 2013. Vaccines in development against West Nile virus. *Viruses.* 5:2384-2409.
- Brault AC, Huang CY-H, Langevin SA, Kinney RM, Bowen RA, Ramey WN, Panella NA, Holmes EC, Powers AM, Miller BR. 2007. A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat Genet.* 39:1162-1166.
- Calvert AE, Huang CY-H, Blair CD, Roehrig JT. 2012. Mutations in the West Nile prM protein affect VLP and virion secretion *in vitro*. *Virol.* 433:35-44.
- [CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2019. Preliminary maps & data for 2018 [Internet]. [dिसितasi 5 September 2019]. Tersedia dari: <https://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/preliminarymapsdata2018/index.html>.
- Chambers T. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Ann Rev Microbiol.* 44:649-688.
- Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M. 2015. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed Res Int.* 2015:376230. doi: 10.1155/2015/376230.
- Chang J, Wang L, Ma D, Qu X, Guo H, Xu X, Mason PM, Bourne N, Moriarty R, Gu B, Guo JT, Block TM. 2009. Novel imino sugar derivatives demonstrate potent antiviral activity against flaviviruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:1501-1508.
- Chowers MY, Lang R, Nassar F, Ben-David D, Giladi M, Rubinshtein E, Itzhaki A, Mishal J, Siegman-Igra Y, Kitzes R, Pick N, Landau Z, Wolf D, Bin H, Mendelson E, Pitlik SD, Weinberger M. 2001. Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerg Infect Dis.* 7:675-678.
- Chu J-HJ, Chiang C-CS, Ng M-L. 2007. Immunization of flavivirus West Nile recombinant envelope domain III protein induced specific immune response and protection against West Nile virus infection. *J Immunol.* 178:2699-2705.
- Colpitts TM, Conway MJ, Montgomery RR, Fikrig E. 2012. West Nile Virus: Biology, Transmission, and Human Infection. *Clin Microbiol Rev.* 25:635-648.
- Cook S, Holmes EC. 2006. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission. *Arch Virol.* 151:309-325.
- Davis CT, Galbraith SE, Zhang S, Whiteman MC, Li L, Kinney RM, Barrett ADT. 2007. A combination of naturally occurring mutations in North American West Nile Virus nonstructural protein genes and in the 3' untranslated region alters virus phenotype. *J Virol.* 81:6111-6116.
- Deas TS, Bennett CJ, Jones SA, Tilgner M, Ren P, Behr MJ, Stein DA, Iversen PL, Kramer LD, Bernard KA, Shi PY. 2007. *In vitro* resistance selection and *in vivo* efficacy of morpholino oligomers against west Nile virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:2470-2482.
- Desprès P, Combredet C, Frenkiel M, Lorin C, Brahic M, Tangy F. 2005. Live Measles Vaccine Expressing the Secreted Form of the West Nile Virus Envelope Glycoprotein Protects against West Nile Virus Encephalitis. *J Infect Dis.* 191:207-214.
- Diamond MS. 2005. Development of effective therapies against West Nile virus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 3:931-944.
- Diamond MS. 2009. Progress on the development of therapeutics against West Nile virus. *Antiviral Res.* 83:214-227.
- Eastwood G, Kramer LD, Goodman SJ, Cunningham AA. 2011. West Nile virus vector competency of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in the Galápagos Islands. *Am J Trop Med Hyg.* 85:426-433.
- Ebel GD, Carricaburu J, Young D, Bernard KA, Kramer LD. 2004. Genetic and phenotypic variation of West Nile virus in New York, 2000-2003. *Am J Trop Med Hyg.* 71:493-500.
- Ebel GD, Fitzpatrick KA, Lim PY, Bennett CJ, Deardorff ER, Jerzak GVS, Kramer LD, Zhou Y, Shi PY, Bernard KA. 2011. Nonconsensus west Nile virus genomes arising during mosquito infection suppress pathogenesis and modulate virus fitness *in vivo*. *J Virol.* 85:12605-12613.
- Elshuber S. 2003. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol.* 84:183-191.
- Escribano-Romero E, Jiménez de Oya N, Domingo E, Saiz JC. 2017. Extinction of West Nile Virus by Favipiravir through Lethal Mutagenesis. *Antimicrob Agents Chemother.* 61:e01400-17.
- Evans JD, Seeger C. 2007. Differential Effects of Mutations in NS4B on West Nile Virus Replication and Inhibition of Interferon Signaling. *J Virol.* 81:11809-11816.
- Fall G, Di Paola N, Faye M, Dia M, Freire CC de M, Loucoubar C, Zanotto PM de A, Faye O, Sall AA. 2017. Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus. Beasley DWC, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 11:e0006078.
- Ferlenghi I, Clarke M, Ruttan T, Allison SL, Schlich J, Heinz FX, Harrison SC, Rey FA, Fuller SD. 2001. Molecular Organization of a Recombinant Subviral Particle from Tick-Borne Encephalitis Virus. *Mol Cell.* 7:593-602.
- Fritz R, Blazevic J, Taucher C, Pangerl K, Heinz FX, Stiasny K. 2011. The Unique Transmembrane Hairpin of Flavivirus Fusion Protein E Is Essential for Membrane Fusion. *J Virol.* 85:4377-4385.
- Gamino V, Höfle U. 2013. Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review. *Vet Res.* 44:39. doi: 10.1186/1297-9716-44-39.
- Gea-Banacloche J, Johnson RT, Bagic A, Butman JA, Murray PR, Agrawal AG. 2004. West Nile virus:

- pathogenesis and therapeutic options. *Ann Intern Med.* 140:545-553.
- Di Giallonardo F, Geoghegan JL, Docherty DE, McLean RG, Zody MC, Qu J, Yang X, Birren BW, Malboeuf CM, Newman RM, Ip HS, Holmes EC. 2016. Fluid Spatial Dynamics of West Nile Virus in the United States: Rapid Spread in a Permissive Host Environment. *J Virol.* 90:862-872.
- Gould LH, Fikrig E. 2004. West Nile virus: a growing concern?. *J Clin Invest.* 113:1102-1107.
- Hall RA, Nisbet DJ, Pham KB, Pyke AT, Smith GA, Khromykh AA. 2003. DNA vaccine coding for the full-length infectious Kunjin virus RNA protects mice against the New York strain of West Nile virus. *Proc Natl Acad Sci.* 100:10460-10464.
- Hanna SL, Pierson TC, Sanchez MD, Ahmed AA, Murtadha MM, Doms RW. 2005. N-Linked glycosylation of West Nile virus envelope proteins influences particle assembly and infectivity. *J Virol.* 79:13262-13274.
- Hayes EB, Gubler DJ. 2006. West Nile Virus: Epidemiology and Clinical Features of an Emerging Epidemic in the United States. *Ann Rev Med.* 57:181-194.
- Hughes TP, Paul JH, Smithburn KC, Burke AW. 1940. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg.* s1-20:471-492.
- Hunt TA, Urbanowski MD, Kakani K, Law L-MJ, Brinton MA, Hobman TC. 2007. Interactions between the West Nile virus capsid protein and the host cell-encoded phosphatase inhibitor, I 2 PP2A. *Cell Microbiol.* 9:2756-2766.
- Iglesias MC, Frenkiel MP, Mollier K, Souque P, Despres P, Charneau P. 2006. A single immunization with a minute dose of a lentiviral vector-based vaccine is highly effective at eliciting protective humoral immunity against West Nile virus. *J Gene Med.* 8:265-274.
- Iyer A, Kousoulas K. 2013. A Review of Vaccine Approaches for West Nile Virus. *Int J Environ Res Public Health.* 10:4200-4223.
- Jordan I, Briese T, Fischer N, Lau JY, Lipkin WI. 2000. Ribavirin Inhibits West Nile Virus Replication and Cytopathic Effect in Neural Cells. *J Infect Dis.* 182:1214-1217.
- Kaiser JA, Barrett ADT. 2019. Twenty years of progress toward West Nile virus vaccine development. *Viruses.* 11:823. doi: 10.3390/v11090823.
- Kalil AC, Devetten MP, Singh S, Lesiak B, Poage DP, Bargaquast K, Fayad P, Freifeld AG. 2005. Use of Interferon- in Patients with West Nile Encephalitis: Report of 2 Cases. *Clin Infect Dis.* 40:764-766.
- Karothia D, Dash PK, Parida M, Bhagyawant S, Kumar JS. 2018. Inhibition of West Nile virus Replication by Bifunctional siRNA Targeting the NS2A and NS5 Conserved Region. *Curr Gene Ther.* 18:180-190.
- Krishnan M, Garcia-Blanco M. 2014. Targeting host factors to treat West Nile and dengue viral infections. *Viruses.* 6:683-708.
- Laurent-Rolle M, Boer EF, Lubick KJ, Wolfenbarger JB, Carmody AB, Rockx B, Liu W, Ashour J, Shupert WL, Holbrook MR, Barrett AD, Mason PW, Bloom ME, García-Sastre A, Khromykh AA, Best SM. 2010. The NS5 protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferon-mediated JAK-STAT signaling. *J Virol.* 84:3503-3515.
- Li L, Lok S-M, Yu I-M, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, Rossmann MG. 2008. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: Structure and maturation. *Science.* 319:1830-1834.
- Li XF, Deng YQ, Yang HQ, Zhao H, Jiang T, Yu XD, Li SH, Ye Q, Zhu SY, Wang HJ, Zhang Y, Ma J, Yu YX, Liu ZY, Li YH, Qin ED, Shi PY, Qin CF. 2013. A chimeric dengue virus vaccine using Japanese encephalitis virus vaccine strain SA14-14-2 as backbone is immunogenic and protective against either parental virus in mice and nonhuman primates. *J Virol.* 87:13694-13705.
- Lim PY, Keating JA, Hoover S, Striker R, Bernard KA. 2011. A thiopurine drug inhibits west nile virus production in cell culture, but not in mice. *PLoS One.* 6:e26697. doi: 10.1371/journal.pone.0026697.
- Lim S, Shi P-Y. 2013. West Nile virus drug discovery. *Viruses.* 5:2977-3006.
- Liu WJ, Wang XJ, Clark DC, Lobigs M, Hall RA, Khromykh AA. 2006. A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *J Virol.* 80:2396-2404.
- Londono-Renteria B, Colpitts TM. 2016. A brief review of West Nile virus biology. *Methods Mol Biol.* 1435:1-13.
- Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. 2002. Folding and Dimerization of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Proteins prM and E in the Endoplasmic Reticulum. *J Virol.* 76:5480-5491.
- Luo Y, Guo X, Yan H, Fang D, Zeng G, Zhou J, Jiang L. 2015. Comprehensive mapping infection-enhancing epitopes of dengue pr protein using polyclonal antibody against prM. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99:5917-5927.
- Lustig Y, Sofer D, Burris ED, Mendelson E. 2018. Surveillance and diagnosis of West Nile virus in the face of flavivirus cross-reactivity. *Front Microbiol.* 9:2421. doi: 10.3389/fmicb.2018.02421.
- Mackenzie JM, Khromykh AA, Parton RG. 2007. Cholesterol manipulation by West Nile virus perturbs the cellular immune response. *Cell Host Microbe.* 2:229-239.
- MacLachlan NJ, Dubovi EJ, Barthold SW, Swayne DE, Winton JR. 2017. *Flaviviridae. Dalam: Fenner's Veterinary Virology.* Amsterdam (Belanda): Elsevier. p. 525-545.
- van Marle G, Antony J, Ostermann H, Dunham C, Hunt T, Halliday W, Maingat F, Urbanowski MD, Hobman T, Peeling J, Power C. 2007. West nile virus-induced neuroinflammation: Glial infection and capsid protein-mediated neurovirulence. *J Virol.* 81:10933-10949.
- Martín-Acebes MA. 2012. West Nile virus: A re-emerging pathogen revisited. *World J Virol.* 1:51-70.

- Martín-Acebes MA, Blázquez AB, Jiménez de Oya N, Escribano-Romero E, Saiz JC. 2011. West Nile virus replication requires fatty acid synthesis but is independent on phosphatidylinositol-4-phosphate lipids. *PLoS One*. 6:e24970. doi: 10.1371/journal.pone.0024970.
- Martín-Acebes MA, Saiz J-C. 2011. A West Nile virus mutant with increased resistance to acid-induced inactivation. *J Gen Virol*. 92:831-840.
- Michaelis M, Kleinschmidt MC, Doerr HW, Cinatl J. 2007. Minocycline inhibits West Nile virus replication and apoptosis in human neuronal cells. *J Antimicrob Chemother*. 60:981-986.
- Monath TP. 2006. Prospects for development of a vaccine against the West Nile virus. *Ann N Y Acad Sci*. 951:1-12.
- Monath TP, Seligman SJ, Robertson JS, Guy B, Hayes EB, Condit RC, Excler JL, Mac LM, Carbery B, Chen RT. 2015. Live virus vaccines based on a yellow fever vaccine backbone: Standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. *Vaccine*. 33:62-72.
- Morrey JD, Day CW, Julander JG, Blatt LM, Smee DF, Sidwell RW. 2004. Effect of interferon-alpha and interferon-inducers on West Nile virus in mouse and hamster animal models. *Antivir Chem Chemother*. 15:67-75.
- Murgue B, Zeller H, Deubel V. 2002. The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe and Asia. *Curr Top Microbiol Immunol*. 267:195-221.
- Murray KO, Mertens E, Desprès P. 2010. West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet Res*. 41:67. doi: 10.1051/vetres/2010039.
- Myint KSA, Kosasih H, Artika IM, Perkasa A, Puspita M, Ma'roef CN, Antonjaya U, Ledermann JP, Powers AM, Alisjahbana B. 2014. Short report: West Nile virus documented in Indonesia from acute febrile illness specimens. *Am J Trop Med Hyg*. 90:260-262.
- Nelson S, Jost CA, Xu Q, Ess J, Martin JE, Oliphant T, Whitehead SS, Durbin AP, Graham BS, Diamond MS, Pierson TC. 2008. Maturation of West Nile Virus Modulates Sensitivity to Antibody-Mediated Neutralization. Buchmeier MJ, editor. *PLoS Pathog*. 4:e1000060. doi: 10.1051/vetres/2010039.
- Nurcahyani D. 2014. 12 Warga Surabaya terinfeksi virus West Nile [Internet]. [diakses pada 6 Januari 2019]. Tersedia dari: <https://lifestyle.okezone.com/read/2014/01/09/82/924113/12-warga-surabaya-terinfeksi-virus-west-nile>.
- Ostlund EN, Crom RL, Pedersen DD, Johnson DJ, Williams WO, Schmitt BJ. 2001. Equine West Nile Encephalitis, United States. *Emerg Infect Dis*. 7:665-669.
- Pachler K, Lebl K, Berer D, Rudolf I, Hubalek Z, Nowotny N. 2014. Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* Mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg Infect Dis*. 20:2119-2122.
- Petersen LR, Brault AC, Nasci RS. 2013. West Nile virus: Review of the literature. *JAMA*. 310:308-315.
- Peyre M, Fusheng G, Desvaux S, Roger F. 2009. Avian influenza vaccines: A practical review in relation to their application in the field with a focus on the Asian experience. *Epidemiol Infect*. 137:1-21.
- Pierce KK, Whitehead SS, Kirkpatrick BD, Grier PL, Jarvis A, Kenney H, Carmolli MP, Reynolds C, Tibery CM, Lovchik J, et al. 2017. A live attenuated chimeric West Nile Virus vaccine, rWN/DEN4Δ30, is well tolerated and immunogenic in Flavivirus-Naive older adult volunteers. *J Infect Dis*. 215:52-55.
- Pletnev AG, Putnak R, Speicher J, Wagar EJ, Vaughn DW. 2002. West Nile virus/dengue type 4 virus chimeras that are reduced in neurovirulence and peripheral virulence without loss of immunogenicity or protective efficacy. *Proc Natl Acad Sci*. 99:3036-3041.
- Pliego Zamora A, Edmonds JH, Reynolds MJ, Khromykh AA, Ralph SJ. 2016. The in vitro and in vivo antiviral properties of combined monoterpene alcohols against West Nile virus infection. *Virology*. 495:18-32.
- Pokidysheva E, Zhang Y, Battisti AJ, Bator-Kelly CM, Chipman PR, Xiao C, Gregorio GG, Hendrickson WA, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2006. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell*. 124:485-493.
- Qiao M, Ashok M, Bernard KA, Palacios G, Zhou ZH, Lipkin WI, Liang TJ. 2004. Induction of sterilizing immunity against West Nile virus (WNV), by immunization with WNV-Like particles produced in insect cells. *J Infect Dis*. 190:2104-2108.
- Qing M, Yang F, Zhang B, Zou G, Robida JM, Yuan Z, Tang H, Shi PY. 2009. Cyclosporine inhibits flavivirus replication through blocking the interaction between host cyclophilins and viral NS5 protein. *Antimicrob Agents Chemother*. 53:3226-3235.
- Qing M, Zou G, Wang Q-Y, Xu HY, Dong H, Yuan Z, Shi P-Y. 2010. Characterization of dengue virus resistance to brequinar in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother*. 54:3686-3695.
- Rice CM, Halevy M, Lustig S, Chambers TJ, Nestorowicz A. 1998. West Nile virus envelope proteins: Nucleotide sequence analysis of strains differing in mouse neuroinvasiveness. *J Gen Virol*. 79:2375-2380.
- Rizzoli A, Jiménez-Clavero M, Barzon L, Cordioli P, Figuerola J, Koraka P, Martina B, Moreno A, Nowotny N, Pardigon N, Sanders N, Ulbert S, Tenorio A. 2015. The challenge of West Nile virus in Europe: Knowledge gaps and research priorities. *Eurosurveillance*. 20:21135.
- Rosenberg R, Lindsey NP, Fischer M, Gregory CJ, Hinckley AF, Mead PS, Paz-Bailey G, Waterman SH, Drexler NA, Kersh GJ, et al. 2018. Vital signs: Trends in reported vectorborne disease cases — United States and territories, 2004-2016. *Morb Mortal Wkly Rep*. 67:496-501.
- Samuel MA, Diamond MS. 2005. Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. *J Virol*. 79:13350-13361.

- Setoh YX, Prow NA, Hobson-Peters J, Lobigs M, Young PR, Khromykh AA, Hall RA. 2012. Identification of residues in West Nile virus pre-membrane protein that influence viral particle secretion and virulence. *J Gen Virol.* 93:1965-1975.
- Shiryaev SA, Chernov AV, Aleshin AE, Shiryaeva TN, Strongin AY. 2009. NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: A novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus. *J Gen Virol.* 90:2081-2085.
- Siirin MT, Travassos Da Rosa APA, Newman P, Weeks-Levy C, Coller BA, Xiao SY, Lieberman MM, Watts DM. 2008. Evaluation of the efficacy of a recombinant subunit West Nile vaccine in Syrian golden hamsters. *Am J Trop Med Hyg.* 79:955-962.
- Szentpáli-Gavallér K, Lim S, Dencsó L, Bányai K, Koraka P, Osterhaus A, Martina B, Bakonyi T, Bálint Á. 2016. In vitro and in vivo evaluation of mutations in the NS region of lineage 2 West Nile virus associated with neuroinvasiveness in a mammalian model. *Viruses.* 8:49.
- Tan TTT, Bhuvanankantham R, Li J, Howe J, Ng M-L. 2009. Tyrosine 78 of pre-membrane protein is essential for assembly of West Nile virus. *J Gen Virol.* 90:1081-1092.
- Ulbert S. 2019. West Nile virus vaccines – current situation and future directions. *Hum Vaccin Immunother.* 15:2337-2342.
- Urbanowski MD, Hobman TC. 2013. The West Nile virus capsid protein blocks apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *J Virol.* 87:872-881.
- Venter M, Steyl J, Human S, Weyer J, Zaayman D, Blumberg L, Leman PA, Paweska J, Swanepoel R. 2010. Transmission of West Nile virus during horse autopsy. *Emerg Infect Dis.* 16:573-575.
- Wang T, Anderson JF, Magnarelli LA, Bushmich S, Wong S, Koski RA, Fikrig E. 2001. West Nile virus envelope protein: Role in diagnosis and immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 951:325-327.
- Watts R, Lane S, Hanslik T, Hauser T, Hellmich B, Koldingsnes W, Mahr A, Segelmark M, Cohen-Tervaert JW, Scott D. 2007. Development and validation of a consensus methodology for the classification of the ANCA-associated vasculitides and polyarteritis nodosa for epidemiological studies. *Ann Rheum Dis.* 66:222-227.
- Whiteman MC, Li L, Wicker JA, Kinney RM, Huang C, Beasley DWC, Chung KM, Diamond MS, Solomon T, Barrett ADT. 2010. Development and characterization of non-glycosylated E and NS1 mutant viruses as a potential candidate vaccine for West Nile virus. *Vaccine.* 28:1075-1083.
- Whiteman MC, Popov V, Sherman MB, Wen J, Barrett ADT. 2015. Attenuated West Nile virus mutant NS1 130-132QQA/175A/207A exhibits virus-induced ultrastructural changes and accumulation of protein in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 89:1474-1478.
- Wicker JA, Whiteman MC, Beasley DWC, Davis CT, McGee CE, Lee JC, Higgs S, Kinney RM, Huang CYH, Barrett ADT. 2012. Mutational analysis of the West Nile virus NS4B protein. *Virology.* 426:22-33.
- Wicker JA, Whiteman MC, Beasley DWC, Davis CT, Zhang S, Schneider BS, Higgs S, Kinney RM, Barrett ADT. 2006. A single amino acid substitution in the central portion of the West Nile virus NS4B protein confers a highly attenuated phenotype in mice. *Virology.* 349:245-253.
- Woods CW, Sanchez AM, Swamy GK, McClain MT, Harrington L, Freeman D, Poore EA, Slifka DK, Poer DeRaad DE, Amanna IJ, Slifka MK, Cai S, Shahamatdar V, Wierzbicki MR, Amegashie C, Walter EB. 2019. An observer blinded, randomized, placebo-controlled, phase I dose escalation trial to evaluate the safety and immunogenicity of an inactivated West Nile virus vaccine, HydroVax-001, in healthy adults. *Vaccine.* 37:4222-4230.
- Yu L, Takeda K, Gao Y. 2017. Characterization of virus-specific vesicles assembled by West Nile virus non-structural proteins. *Virology.* 506:130-140.
- Zehender G, Veo C, Ebranati E, Carta V, Rovida F, Percivalle E, Moreno A, Lelli D, Calzolari M, Lavazza A, Chiapponi C, Baioni L, Capelli G, Ravagnan S, Da Rold G, Lavezzo E, Palù G, Baldanti F, Barzon L, Galli M. 2017. Reconstructing the recent West Nile virus lineage 2 epidemic in Europe and Italy using discrete and continuous phylogeography. *PLoS One.* 12:e0179679.
- Zhang L, Zhang Z, Weng Z. 2013. Rapid reassortment of internal genes in avian influenza A (H7N9) virus. *Clin Infect Dis.* 57:1059-1061.
- Zhang S, Li L, Woodson SE, Huang CYH, Kinney RM, Barrett ADT, Beasley DWC. 2006. A mutation in the envelope protein fusion loop attenuates mouse neuroinvasiveness of the NY99 strain of West Nile virus. *Virol.* 353:35-40.
- Zhang X, Jia R, Shen H, Wang M, Yin Z, Cheng A. 2017. Structures and functions of the envelope glycoprotein in flavivirus infections. *Viruses.* 9:338.
- Zhang Y. 2003. Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J.* 22:2604-2613.
- Zhang Y, Kaufmann B, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG. 2007. Structure of Immature West Nile Virus. *J Virol.* 81:6141-6145.
- Zhou Y, Ray D, Zhao Y, Dong H, Ren S, Li Z, Guo Y, Bernard KA, Shi P-Y, Li H. 2007. Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. *J Virol.* 81:3891-3903.
- Zohaib A, Niazi SK, Saqib M, Sajid MS, Khan I, Sial A-R, Athar MA, Taj Z, Abbas G, Rathore MA, et al. 2019. Detection of West Nile virus lineage 1 sequences in blood donors, Punjab Province, Pakistan. *Int J Infect Dis.* 81:137-139.
- Zou G, Zhang B, Lim P-Y, Yuan Z, Bernard KA, Shi P-Y. 2009. Exclusion of West Nile Virus Superinfection through RNA Replication. *J Virol.* 83:11765-11776.
- Zybert IA, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Smit JM. 2008. Functional importance of dengue virus maturation: Infectious properties of immature virions. *J Gen Virol.* 89:3047-3051.