

Ringkasan Pengkajian Keamanan Lingkungan Produk Rekayasa Genetik

Vaksin Porcilis® PCV M Hyo

I. Pendahuluan

Vaksin Porcilis® PCV M Hyo merupakan vaksin inaktif yang mengandung dua jenis antigen yaitu subunit antigen *Open Reading Frame 2* dari *Porcine circovirus type 2* (PCV2) menggunakan sistem ekspresi *Baculovirus* dan *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*). Oleh karena itu, vaksin Porcilis® PCV M Hyo ini dapat mencegah penyakit yang disebabkan oleh infeksi PCV2 dan *M. hyopneumoniae* yang merupakan penyebab utama terjadinya *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome* (PMWS) pada babi. Dibanding dengan vaksin konvensional, vaksin ini memiliki keunggulan lain yaitu aman karena bukan berupa virus utuh, *duration of immunity* lebih lama, produksi dapat dilakukan dengan cepat dan efisien, serta dapat diberikan pada anak babi yang memiliki antibodi maternal terhadap PCV2.

Vaksin Porcilis® PCV M Hyo yang diproduksi oleh Intervet International BV (MSD Animal Health), Belanda dan yang akan dipasarkan oleh PT Intervet Indonesia ini telah terdaftar serta memperoleh *Certificate of Free Sales* di 52 negara, diantaranya beberapa negara maju seperti Australia (2017), Belanda (2014), Federasi Rusia (2015), Inggris (2014), Jerman (2014), Perancis (2014), Selandia Baru (2017), Spanyol (2014), dan beberapa negara Asia seperti Filipina (2015), Korea Selatan (2017), Taiwan (2018), Thailand (2016), dan Vietnam (2018).

Berdasarkan Peraturan Pemerintah No.21 Tahun 2005 tentang Keamanan Hayati Produk Rekayasa Genetik, dan Peraturan Menteri Lingkungan Hidup No. 25 Tahun 2012 tentang Pedoman Penyusunan Analisis Risiko Lingkungan Produk Rekayasa Genetik, maka Tim Teknis Keamanan Hayati Produk Rekayasa Genetik (TTKH PRG) telah melakukan pengkajian keamanan lingkungan vaksin Porcilis® PCV M Hyo. Pengkajian didasarkan pada informasi genetik dan informasi keamanan lingkungan yang terdiri atas, sifat genetik yang direkayasa, stabilitas genetik jasad renik PRG, kemampuan penyebaran jasad renik, hospes alami dari tetua jasad renik PRG dan kemungkinan menimbulkan risiko terhadap lingkungan, sebagaimana diuraikan di bawah ini.

II. Informasi Jasad Renik PRG

II.1 Deskripsi Umum Jasad Renik PRG

Jasad renik tetua yang digunakan untuk memproduksi komponen antigen PCV2 pada Porcilis® PCV M Hyo adalah *Authographa californica Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus* (AcMNPV) yang merupakan spesies dari *Baculovirus* yang disisipi gen pengkode protein kapsid dari ORF2 dari PCV2 strain WT2/1 sebagai gen donor.

II.2. Informasi Sifat Genetik Jasad Renik

Jasad renik tetua dari vaksin Porcilis® PCV M Hyo adalah AcMNPV yang merupakan spesies dari *Baculovirus* yang secara ekstensif digunakan sebagai vektor yang efisien untuk produksi protein prokariot dan eukariot dengan tingkat ekspresi yang tinggi selama lebih dari 2 dekade (Luckow dan Summers, 1988; Maeda, 1995).

Donor gen dari vaksin Porcilis® PCV M Hyo adalah gen pengkode protein kapsid dari ORF2 dari PCV2 strain WT2/1 yang disisipkan pada genom *Baculovirus* AcMNPV untuk menghasilkan jasad renik PRG “BacPCV2-Orf2”. Protein ORF2 merupakan protein kapsid virus yang menyandi protein struktural PCV (Karuppanan dan Opriessnig, 2017) dan bersifat imunogenik (Fan *et al.*, 2007). Protein ini juga telah umum digunakan dalam produksi vaksin untuk babi. Oleh karena itu, protein ORF2 merupakan kandidat vaksin yang ideal terhadap PCV2.

Lokasi penyisipan kaset ekspresi yang mengandung gen ORF2 dari PCV2 beserta dengan sekuen regulatornya adalah pada posisi basa 118.839-119.123 (pada segmen gen p10) dari genom *Baculovirus* AcMNPV (*GenBank* n.a. NC_001623.1, Anonim, tanggal diakses: 6 Oktober 2018). Jumlah kopi gen ORF2 yang disisipkan adalah satu kopi.

Baculovirus rekombinan “BacPCV2-Orf2” bersifat stabil secara genetik. Hal ini telah dibuktikan dengan pasase sebanyak 5 kali dan tidak ditemukan mutasi pada sekuen ORF2 PCV2 yang disisipkan (MSD Animal Health, *Report 06R/0209 Genetic Stability of The Recombinant Baculovirus BacPCV2-ORF2 After Passage in Insect Cells*, 2006).

II.3 Metode Konstruksi Genetik

Jasad renik PRG *Master Seed Virus* (MSV) “BacPCV2-Orf2” dihasilkan dari rekombinan antara genom *Baculovirus* AcMNPV dengan gen ORF2 PCV2 strain WT2/1 pada posisi gen p10 (di belakang sekuen promoter p10).

Metode konstruksi genetik “BacPCV2-Orf2” adalah sebagai berikut:

1. Konstruksi diawali dengan pengujian untuk mengetahui apakah sekuen ORF2 PCV2 yang menyandi protein kapsid PCV2 dapat diekspresikan dengan menggunakan promoter polyhedrin. Sekuen ORF2 diamplifikasi dari DNA PCV2 strain PCV WT2/1 menggunakan primer yang didesain khusus, menghasilkan fragmen berukuran sekitar 750 pb yang mengandung sekuen lengkap dari ORF2 PCV2 diapit dengan tapak enzim restriksi *Bam*HI. Produk PCR yang dihasilkan selanjutnya diklon pada tapak enzim restriksi *Bam*HI dari plasmid pFastBacHTa (Invitrogen). Gen ORF2 PCV2 disisipkan setelah promoter polyhedrin. Plasmid rekombinan ini disebut dengan pFastBacOrf2. Plasmid rekombinan ini kemudian ditransformasikan ke *E. coli* DH10Bac™ yang mengandung Bacmid bMON14272 dan plasmid helper tMON7124

yang mengandung gen transposase, sehingga dapat terjadi rekombinan Bacmid ORF2. Rekombinan Bacmid ORF2 ini ditransfeksikan ke sel insekta Sf9 untuk menghasilkan protein rekombinan. Ekspresi dari protein ORF2 PCV2 dikonfirmasi melalui analisa gel *sodium dodecyl sulfate* (SDS) dengan memperlihatkan pita protein berukuran 25 hingga 30 kD setelah infeksi sel insekta Sf9. Konfirmasi juga dilakukan dengan pewarnaan imunoflourosensi pada kultur monolayer sel serangga yang terinfeksi dengan antibodi monoklonal 5/6H12 (PCV *biotinylated mouse monoclonal antibody specific ORF2*).

2. Setelah tahapan pengujian memperlihatkan sekuen ORF2 PCV2 dapat diekspresikan secara efisien dengan promoter gen polyhedrin pada vektor pFastBac, gen selanjutnya dipindahkan ke vektor ekspresi *Baculovirus* untuk produksi skala besar. Fragmen dengan ukuran sekitar 750 pb diisolasi dari plasmid pFastBac ORF2 dan diklon kembali pada tapak enzim restriksi *Bam*HI dari pAcAS3 setelah promoter gen p10. Plasmid rekombinan ini diberi nama pAcAS3+ORF2. Plasmid ini kemudian ditransfeksikan bersama dengan *Baculovirus* vAcOT-Bsu36I yang telah dibuat linier ke dalam kultur sel serangga Sf9. Selanjutnya dilakukan seleksi *plaque Baculovirus* sehingga diperoleh rekombinan vAC-PCII 9121 sebagai *pre-master seed virus*. Ekspresi protein ORF2 PCV2 dari rekombinan *Baculovirus* ini dideteksi dengan teknik Western blot dengan antibodi monoklonal 5/6H12. DNA genomik *Baculovirus* vAC-PCII 9121 diisolasi dan ditransfeksikan ke dalam kultur sel serangga Sf21 untuk menghasilkan rekombinan virus MSV-BAC/PCV2-ORF2;98-99.

Rekombinan ini dipasase 5 kali untuk menguji stabilitasnya. Stabilitas ekspresi protein “BacPCV2-Orf2” dideteksi dengan teknik Western blot dengan antibodi monoklonal 38C1. Stabilitas sekuens *Baculovirus* rekombinan dibuktikan dengan analisis sekuens. Rekombinan yang stabil diberi nama “BacPCV2-Orf2”.

3. Ekspresi ORF2 dari “BacPCV2-Orf2” pada sel Sf21 dianalisis dengan elektroforesis gel poliakrilamid (PAGE) di bawah kondisi denaturasi, diikuti dengan *Western Blot* menggunakan antibodi monoklonal terhadap *wild type* PCV2. Produk ekspresi memiliki berat molekul 28 kDa, seperti yang diharapkan, dan bereaksi secara spesifik dengan antibodi monoklonal terhadap PCV2.

Langkah lengkap konstruksi *Baculovirus* rekombinan terdapat pada *Report 07R/0152 Construction of a Recombinant Baculovirus Expressing PCV2 ORF2 in Insect Cells* (MSD Animal Health, 2007).

II.4 Karakter Modifikasi Genetik

Secara genotip, genom *Baculovirus* AcMNPV memiliki gen polyhedrin dan p10 yang merupakan promoter kuat namun tidak esensial dalam replikasi virus, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai sarana ekspresi protein asing atau rekombinan (Possee, 1997). Secara fenotip, penyisipan gen ORF2 dari PCV2 akan menyebabkan *Baculovirus* rekombinan ini mengekspresikan protein kapsid yang bersifat imunogenik dan protektif terhadap infeksi *Porcine circovirus type 2* (PCV2) (Fan *et al.*, 2007).

II.5 Kemungkinan Terjadinya Gen yang Disisipkan pada Jasad Renik PRG untuk Vaksin Hewan Dipindahkan ke Organisme Lain

Peluang sekuen ORF2 PCV2 untuk dapat disisipkan pada genom vektor ekspresi *Baculovirus* dapat dipindahkan ke organisme lain sangat kecil karena tidak ada kesesuaian sekuens dengan genom babi dan manusia. *Baculovirus* memiliki tingkat spesifitas inang yang tinggi dan tidak dapat menginfeksi sel vertebrata (Hartig *et.al*, 1991). Oleh karena itu, *Baculovirus* yang digunakan untuk produksi antigen ORF2 PCV2 tidak dapat terintegrasi dengan genom babi ataupun genom mamalia lainnya. Selain itu, produk akhir vaksin Porcilis® PCV M Hyo tidak mengandung rekombinan *Baculovirus* yang hidup.

PCV2 sebagai gen donor virus tidak bersifat zoonosis bagi manusia. Menurut Allan *et al.* (2000), tidak ditemukan antibodi terhadap PCV2 pada sera sapi, domba, dan manusia yang dianalisa dengan metode *indirect immunofluorescence* (IIF). Bahkan menurut Ellis *et al.* (2000), PCV2 tidak menginfeksi atau menyebabkan penyakit pada manusia yang berinteraksi langsung dengan babi yang terinfeksi atau berinteraksi dengan kultur murni PCV2. Burbelo *et al.* (2013) meneliti bahwa pemeriksaan terhadap donor darah manusia serta serum kuda dan sapi tidak menunjukkan keberadaan antibodi PCV2. Sebagai tambahan, analisa terhadap dua kelompok manusia berisiko tinggi yaitu, pasien penderita *cystic fibrosis* yang diberikan suplemen derivat babi dan pasien penderita diabetes tipe-I yang telah menjalani transplantasi sel-sel islet babi, menunjukkan tidak ada antibodi PCV2. Hal tersebut menunjukkan bahwa PCV2 tidak bersifat infeksius pada manusia.

II.6 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengkajian informasi genetik dapat disimpulkan bahwa:

- a. Penyisipan subunit antigen protein kapsid dari ORF2 dari PCV2 pada *Baculovirus*, dibandingkan dengan vaksin konvensional dapat memberikan nilai tambah berupa aman karena bukan berupa virus utuh, *duration of immunity*nya lebih lama, produksi dapat dilakukan dengan lebih cepat dan efisien, dapat diberikan pada anak babi yang memiliki antibodi maternal terhadap PCV2, serta mampu memberikan proteksi terhadap dua jenis penyakit, yaitu infeksi PCV2 dan *M. hyopneumoniae*.
- b. Virus rekombinan "BacPCV2-Orf2" mengandung satu gen ORF2 dari PCV2 yang bersifat stabil secara genotip dan fenotip.
- c. Gen pengkode protein kapsid dari ORF2 dari PCV2 yang disisipkan dalam jasad renik PRG ("BacPCV2-Orf2") tidak mungkin menyebar atau pindah ke organisme lain.
- d. Kedua jenis antigen pada vaksin Porcilis® PCV M Hyo yaitu subunit antigen ORF2 dari PCV2 (Allan *et al* 2000) dan *M hyopneumoniae* ((Maes *et al.*, 2017) tidak bersifat zoonosis

III. Informasi Keamanan Lingkungan

III.1 Kemampuan Penyebaran Jasad Renik

Porcilis® PCV M Hyo tidak mengandung jasad renik PRG aktif pada produk akhirnya karena dalam proses produksinya, antigen ORF2 dari PCV2 sudah melewati beberapa tahapan purifikasi dan proses inaktivasi sehingga diperoleh protein rekombinan ORF2 murni. Walaupun jasad renik tetua yaitu *Baculovirus* dapat menginfeksi 39 jenis spesies larva Lepidoptera dari 13 famili berbeda (Bonning dan Hammock, 1992) tetapi tidak dapat bereplikasi dan bertahan pada sel vertebrata (Hartig *et al*, 1991). Oleh karena itu, *Baculovirus* tidak dapat diisolasi kembali dan tidak akan dieksresikan oleh babi yang divaksinasi.

III.2 Informasi Cakupan Inang Organisme Tetua Virus PRG untuk Vaksin

Jasad renik tetua vaksin Porcilis® PCV M Hyo adalah *Baculovirus* AcMNPV. Inang alami dari virus tersebut adalah ngengat *alfalfa looper* (*Autographa californica*) yang merupakan ordo Lepidoptera (Bonning dan Hammock, 1992). Meskipun demikian, produk akhir vaksin Porcilis® PCV M Hyo tidak mengandung *Baculovirus* rekombinan (MSD Animal Health, *Report 07R/0152 Construction of a Recombinant Baculovirus Expressing PCV2 ORF2 in Insect Cells*, 2007).

III.3 Informasi Kajian Molekuler

Modifikasi genetik dilakukan dengan penyisipan gen ORF2 dari PCV2 strain WT2/1 sebesar 750 pb ke *Baculovirus* AcMNPV pada posisi lokus gen p10 sehingga menjadi *Baculovirus* rekombinan "BacPCV2-Orf2". Penyisipan ORF2 dari PCV2 pada lokus gen p10 bertujuan agar ekspresi gen ORF2 PCV2 terjadi di bawah kendali promotor p10.

Virus rekombinan "BacPCV2-Orf2" mengandung satu gen ORF2 yang bersifat stabil secara genotip dan fenotip, serta tidak ada kemungkinan penyebaran atau pemindahan gen ORF2 PCV2 yang disisipkan dalam jasad renik PRG ("BacPCV2-Orf2") ke organisme lain sehingga aman terhadap lingkungan.

Penanda yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi jasad renik PRG ini adalah sekuens gen VP2 virus PCV2 strain PCV WT2/1. Teknik untuk mengidentifikasi sekuens ini dapat menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dengan menggunakan primer sebagai berikut:

Forward primer P1: 5'- gCA TTT gAg gAT gCC ggg ACC - 3'

Reverse primer P2: 5' – g gAT CCT TTA TCA CTT CgT AAT ggT T - 3'

PCR ini akan mengamplifikasi sekuens promotor p10 gen ORF2 dan terminator SV40 yang keseluruhannya berukuran 1.100 pb (MSD Animal Health, *Report 06R/0209 Genetic Stability of The Recombinant Baculovirus BacPCV2-ORF2 After Passage in Insect Cells*, 2006).

III.4 Kemungkinan Dampak Negatif Jasad Renik PRG Vaksin terhadap Lingkungan

Tidak ada kemungkinan transfer gen ORF2 PCV2 ke organisme lain. Hal ini ditunjukkan dengan hasil analisis BLAST dari gen ORF2 PCV2 yang tidak ada homologi dengan sekuens genom organisme lain.

Baculovirus rekombinan (“BacPCV2-Orf2”) tidak memiliki potensi penyebaran kepada hewan dan/atau ikan nontarget serta manusia dan lingkungan. Hal ini dikarenakan *Baculovirus* AcMNPV memiliki tingkat spesifisitas inang yang tinggi, tidak memiliki kemampuan untuk bereplikasi pada manusia, dan tidak bersifat zoonosis (Kwang *et al.*, 2016).

IV. Kesimpulan

1. Berdasarkan kajian stabilitas genotip dan fenotip, *master seed virus* rekombinan “BacPCV2-Orf2” bersifat stabil.
2. TTKH PRG Bidang Keamanan Lingkungan menilai bahwa vaksin Porcilis® PCV M Hyo yang diajukan adalah aman terhadap lingkungan karena tidak mengandung jasad renik PRG aktif, sehingga tidak berisiko menyebarkan jasad renik ke lingkungan.
3. Vaksin Porcilis® PCV M Hyo tidak boleh digunakan sebagai vaksin babi sebelum memperoleh Sertifikat Keamanan Lingkungan dari Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan.
4. Apabila telah ditetapkan aman lingkungan, kemudian produk tersebut terbukti menimbulkan risiko terhadap kesehatan manusia dan hewan maka pemohon wajib melakukan tindakan pengendalian dan penanggulangan serta memusnahkan vaksin Porcilis® PCV M Hyo yang berada di wilayah teritori Indonesia.
5. Apabila kemudian ditemukan data dan informasi baru yang tidak sesuai dengan data keamanan lingkungan yang diperoleh hingga saat ini, maka status keamanan lingkungan terhadap vaksin Porcilis® PCV M Hyo perlu dikaji ulang.

Pustaka

1. Allan GM, McNeilly F, McNair I, Curran MD, Walker I, Ellis J, Konoby C, Kennedy S, Meehan B. 2000. Absence of evidence for porcine circovirus type 2 in cattle and humans, and lack of seroconversion or lesions in experimentally infected sheep. *Arch Virol.* 145(4):853–857.
2. Burbelo PD, Ragheb JA, Kapoor A, Zhang Y. 2013. The serological evidence in humans supports a negligible risk of zoonotic infection from porcine circovirus type 2. *Biologicals.* 41(6):1–10.
3. Bonning BC, Hammock BD. 1992. Development and potential of genetically engineered viral insecticides. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 10:455–489.
4. Dossier - Summary of Product Characteristics Porcilis PCV M Hyo.
5. Ellis JA, Wiseman BM, Allan G, Konoby C, Krakowka S, Meehan BM, McNeilly F. 2000. Analysis of seroconversion to porcine circovirus 2 among veterinarians from the United States and Canada. *J Am Vet Med Assoc* 217(1):1645–1646.
6. Fan H, Ju C, Tong T, Huang H, Lv J, Chen H. 2007. Immunogenicity of empty capsids of porcine circovirus type 2 produced in insect cells. *Vet Res Commun.* 31(4):487–496.
7. Hartig PC, Cardon MC, Kawanishi CY. 1991. Insect virus: assays for viral replication and persistence in mammalian cells. *J Virol Method.* 31 (1991): 335–344.

8. Kwang TW, Zeng X, Wang S. 2016. Manufacturing of AcMNPV *Baculovirus* vectors to enable gene therapy trials. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 3(15050):1-8.
9. Luckow VA, Summers MD. 1988. Trends in the development of *Baculovirus* expression vectors. *Bio/Technology.* 6:47-55.
10. Maes D, Sibila M, Kuhnert P, Segales J, Haesebrouck F, Pieters M. 2017. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control. *Transb Emerg Dis.* 65 (Suppl.1): 110-124.
11. MSD Animal Health. 2006. Report 06R/0209: Genetic Stability of The Recombinant *Baculovirus* BacPCV2-ORF2 After Passage in Insect Cells. Boxmeer [NL]: Intervet – Boxmeer R&D Laboratories.
12. MSD Animal Health. 2007. Report 07R/0152: Construction of a Recombinant *Baculovirus* Expressing PCV2 ORF2 in Insect Cells. Boxmeer [NL]: Intervet – Boxmeer R&D Laboratories.
13. Possee RD. 1997. *Baculoviruses* as expression vectors. *Curr Opin Biotechnol.* 8(5):569-572.
14. Rahman MM, Gopinathan KP. 2003. Analysis of host specificity of two closely related baculoviruses in permissive and nonpermissive cell lines. *Virus research.* 93(2003):13-23.