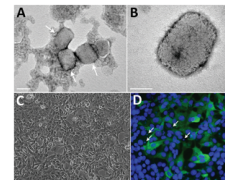




UPDATE PEMERIKSAAN LABORATORIUM UNTUK VIRUS MPOX

BALAI BESAR LABORATORIUM BIOLOGI KESEHATAN

Direktorat Jenderal Kesehatan Masyarakat
Kementerian Kesehatan
2024

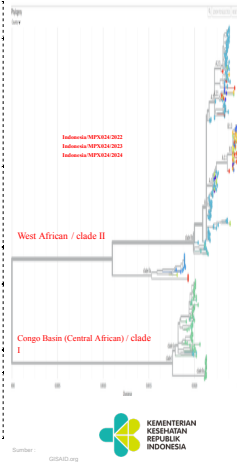


- **Mpox** (sebelumnya dikenal dengan nama monkeypox) merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh **Virus Monkeypox (MPXV)**
- Virus *Monkeypox* (MPXV) termasuk dalam **genus Orthopoxvirus, famili Poxviridae**
- Termasuk virus golongan DNA ukuran Genome **~200 kb**
- Diisolasi tahun 1958 dari primata, tahun 1970 dilaporkan kasus pada anak 9 tahun di negara Kongo
- **Pox** berasal dari bahasa Inggris (*abad 15*) yaitu Pockes/pocke = Pock yang berarti pustula, melepuh (*blister*), bisul (*ulcer*)
- Beberapa patogen orthopoxvirus = Cowpox virus, Variolla Virus (penyebab smallpox/cacar)



Saat ini terdapat 2 Clade MPXV yang beredar di Dunia

	Clade I (Afrika Tengah/Congo Basin)	Clade II (Afrika Barat)
Epidemiologi	<ul style="list-style-type: none"> • Kasus meningkat di Republik Demokratik Kongo (RDK) sejak 2023 • Menginfeksi anak-anak melalui kontak dengan hewan dan/atau anggota rumah tangga yang terinfeksi • Anak-anak mengalami penyakit yang lebih parah daripada orang dewasa 	<ul style="list-style-type: none"> • Terbagi menjadi Sub-clade Ila dan Iib sejak 2022 • Merupakan penyakit endemik di Afrika Barat • Umumnya tidak terlihat pada anak-anak.
Gejala	<ul style="list-style-type: none"> • Penyebab kematian, terutama pada orang yang mengalami gangguan kekebalan tubuh. • Ruam yang menutupi sebagian besar tubuh, termasuk wajah dan dada. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ruam tidak selalu menutupi seluruh tubuh, pertama kali muncul sebagai satu atau beberapa luka di sekitar mulut atau area genital.
CFR	1-10%	1% - 4%
Penyebaran	<ul style="list-style-type: none"> • Kontak seksual LSL • paparan terhadap hewan pembawa penyakit, benda terkontaminasi 	<ul style="list-style-type: none"> • Kontak seksual LSL
Deteksi	<i>Nucleic Acid Amplification Test (NAAT) dan Whole Genome Sequencing (characterization)</i>	
Genom	<ul style="list-style-type: none"> • Linear DNA sepanjang ~200kb • Delesi pada Clade I dan Clade II menjadi penyebab kegagalan deteksi NAAT, sehingga diperlukan adanya monitoring genomik 	



Strategi penanganan Mpox di Indonesia

1 Surveilans

1. Penemuan kasus aktif di seluruh faskes
2. Penyelidikan Epidemiologi bersama komunitas dan mitra HIV/AIDS
3. **Persiapan Laboratorium Rujukan**
Pemeriksaan Mpox di Laboratorium Tier 4
4. **Pemeriksaan WGS terhadap kasus konfirmasi Mpox di BB Biologi Kesehatan NAR**
5. Pencatatan dan Laporan Mpox melalui NAR
6. Notifikasi ke WHO

2 Terapeutik

1. Pemberian terapi simtomatis
2. Tergantung pada derajat keparahan kasus, apabila ringan maka isolasi mandiri di rumah dengan pengawasan dari Puskesmas setempat. Kasus derajat berat dirawat di rumah sakit.

Ketersediaan Obat

3. Cidofovir Injeksi 50 vial (ED: Oktober 2025)
4. Probenecid 500 tab (ED: Februari 2028)
5. Probenecid 300 tab (ED: Agustus 2027)
6. Tecovirimat 19 botol (ED: Oktober 2025)
7. Tecovirimat 1 botol (ED: Agustus 2029)
8. Tecovirimat 1008 botol (ED: Oktober 2029)

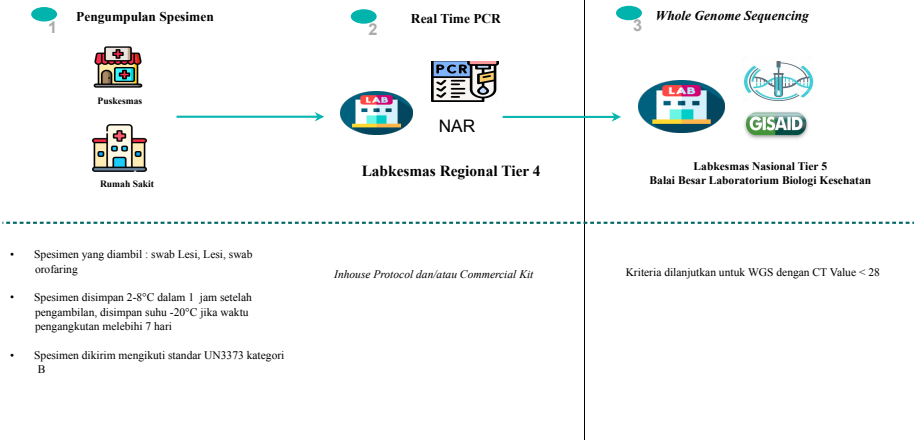
3 Vaksinasi

1. Sasaran: Kelompok LSL dengan kriteria 2 minggu terakhir melakukan hubungan seksual berisiko termasuk LSL dengan ODHIV
2. Bantuan dari ASEAN sebanyak 2.850 dosis vaksin MPOX (*stockpile* di Brunei)
3. Pemesanan 1.600 vial vaksin dari Denmark

Komunikasi Risiko

1. Pelibatan mitra HIV/AIDS
2. Sosialisasi kewaspadaan ke tenaga kesehatan dan masyarakat (komunitas kunci)
3. Penyampaian Surat Edaran kewaspadaan bagi Dinkes, KKP, Lab, Faskes dan mitra
4. Penyampaian media komunikasi seperti LAC, video.

Algoritma Pemeriksaan Deteksi Virus Monkey Pox



DEFINISI KASUS DAN SUSPEK

Berdasarkan Panduan WHO dan Kemenkes

A person who is a contact of a probable or confirmed mpxv case in the 21 days before the onset of signs or symptoms, and who presents with any of the following: acute onset of fever (>38.5°C), headache, myalgia (muscle pain/body aches), back pain, profound weakness or fatigue.

OR

A person presenting since 01 January 2022 with an unexplained acute skin rash, mucosal lesions or lymphadenopathy (swollen lymph nodes). The skin rash may include single or multiple lesions in the ano-genital region or elsewhere on the body. Mucosal lesions may include single or multiple oral, conjunctival, urethral, penile, vaginal, or anorectal lesions. Anorectal lesions can also manifest as anorectal inflammation (proctitis), pain and/or bleeding.

AND

for which the following common causes of acute rash or skin lesions do not fully explain the clinical picture: varicella zoster, herpes zoster, measles, herpes simplex, bacterial skin infections, disseminated gonococcal infection, primary or secondary syphilis, chancroid, lymphogranuloma venereum, granuloma inguinale, molluscum contagiosum, allergic reaction (e.g. to plants); and any other locally relevant common causes of papular or vesicular rash.

- Seseorang yang memiliki kontak dengan kasus *probable* atau konfirmasi dalam 21 hari sebelum onset gejala/tanda, dan memiliki satu atau lebih gejala/tanda sebagai berikut:
 - demam akut (>38.5°C),
 - sakit kepala,
 - nyeri otot,
 - sakit punggung,
 - kelelahan tubuh (fatigue).

ATAU

- Seseorang yang sejak 1 Januari 2022 memiliki gejala ruam kulit akut, lesi pada mukosa atau limfadenopati. Ruam pada kulit termasuk lesi tunggal atau lesi jamak (multipel) pada area anogenital atau area tubuh lainnya. Lesi mukosa meliputi lesi tunggal atau jamak pada mulut, konjungtiva, uretra, penis, vagina atau lesi pada anorektal. Lesi anorektal dapat juga bermanifestasi sebagai inflamasi anorektal (*proctitis*), nyeri dan/atau perdarahan.

DAN
Penyebab umum ruam akut berikut tidak menjelaskan gambaran klinis: *varicella zoster*, *herpes zoster*, campak, herpes simpleks, infeksi kulit bakteri, infeksi *gonococcus disseminata*, sifilis primer atau sekunder, *chancroid*, *lymphogranuloma venereum*, *granuloma inguinale*, moluscum contagiosum, reaksi alergi (misalnya, terhadap tanaman); dan penyebab umum lainnya yang relevan secara lokal dari ruam papular atau vesikular.

Keterangan:
*Tidak perlu mendapatkan hasil laboratorium negatif untuk daftar penyebab umum penyakit ruam untuk mengklasifikasikan kasus sebagai suspek/probable. Selain itu, jika kecurigaan terhadap infeksi mpxv tinggi karena riwayat dan/atau manifestasi klinis atau kemungkinan paparan kasus, identifikasi suatu patogen lain yang menyebabkan ruam tidak menyingkirkan pemeriksaan tes mpxv karena ko-infeksi telah teridentifikasi.

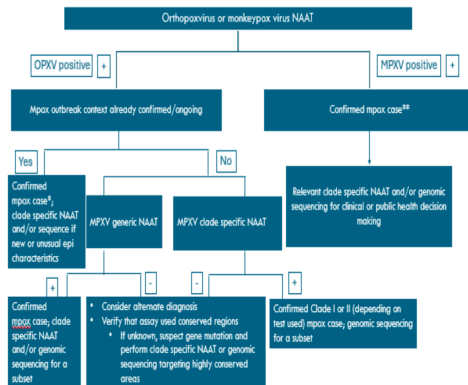
Diagnostic testing for the monkeypox virus (MPXV): interim guidance, 10 May 2024 (who.int)



6

Algoritma pemeriksaan virus mpxv (Guidelines WHO, 2024)

Konfirmasi infeksi MPXV didasarkan pada pengujian amplifikasi asam nukleat (NAAT), menggunakan metoda PCR secara real-time atau konvensional



- Protokol PCR untuk mendeteksi OPXV dan MPXV
- Protokol PCR untuk deteksi MPXV
- WGS untuk menentukan clade virus dan memahami epidemiologi



JENIS SPESIMEN

- Jenis spesimen yang direkomendasikan untuk konfirmasi laboratorium MPOX adalah **Lesi kulit** atau **Usapan permukaan lesi dan/atau eksudat atau krusta lesi**.
- **Swab kering (tanpa VTM)** maupun **Swab yang ditempatkan di media transpor virus (VTM)** dapat digunakan.
- Pengambilan sebaiknya dilakukan pada Lokasi yang berbeda pada Tubuh.
- Lesi, krusta, dan cairan vesikular tidak boleh dicampur dalam tabung yang sama.
- Jika memungkinkan, diambil 2 swab untuk *Back Up* Pemeriksaan

Catatan :

Selain spesimen lesi, pengumpulan **swab orofaringeal** dianjurkan. Namun, data keakuratan jenis spesimen ini untuk diagnosis terbatas untuk Mpxv, oleh karena itu spesimen usap tenggorokan yang negatif harus ditafsirkan dengan hati-hati.

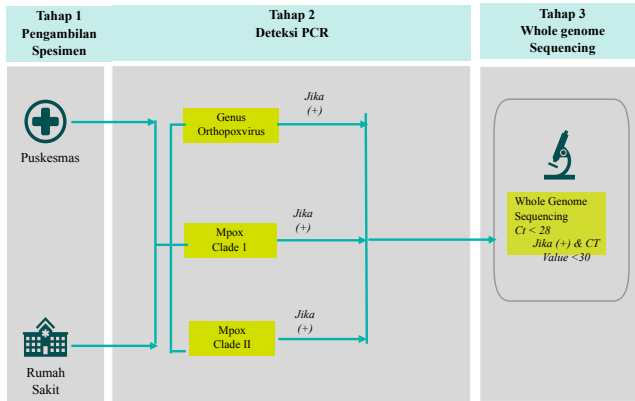


Examples of Mpxv Rashes

Photo credit: UK Health Security Agency



Algoritma pemeriksaan virus mpox menggunakan reagen komersil/in house



- Genus Orthopoxvirus atau Kit komersil general untuk deteksi clade 1 dan clade 2
- Saat ini, MPXV Clade 1 dan Clade 2 masih merupakan primer *in house*
- Penentuan hasil laboratorium didukung dengan data klinis dan epidemiologi



Beberapa contoh Kit PCR untuk deteksi MPXV

Disclaimer : Kit komersial sebagai informasi alternatif, bukan endorsment

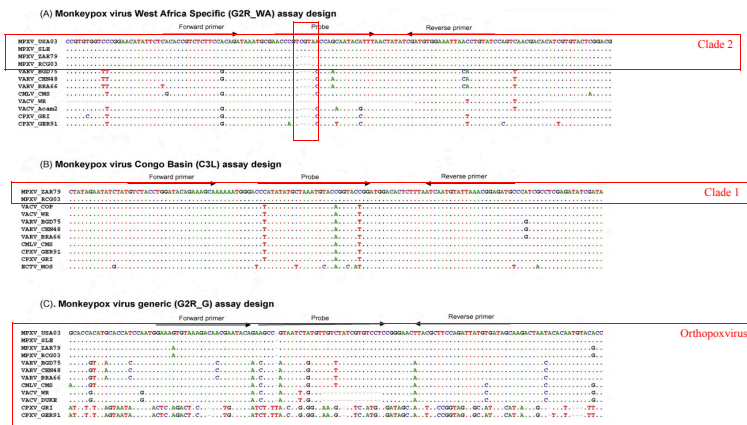
Deteksi MPXV (TIDAK BISA membedakan Clade 1 dan Clade 2)	Deteksi MPXV (MEMBEDAKAN Clade 1, dan Clade 2)
Menggunakan conserve gene F3L untuk deteksi OPV atau MPXV Clade 1 dan Clade 2	Primer dan Probe In house untuk : • Clade 1 • Clade 2 (Li et al)
<ol style="list-style-type: none"> 1. BioDetect Monkeypox Virus Molecular Diagnostic Kit Fluorescent PCR Test Lyophilized 2. TIANLONG Monkeypox Virus Nucleic Acid Detection Kit Fluorescence PCR Method 3. Sansure Biotech Monkeypox Virus Nucleic Acid 4. Novaplex MPOX/OPXV assay 5. Allplex MPCV Assay 6. Altona RealStar® Zoonotic Orthopoxvirus PCR Kit 1.0 7. Bioperfectus Technologies Monkeypox Virus Real Time PCR Kit 8. DaAn Gene Detection Kit for Monkeypox Virus DNA 9. Shanghai ZJ Bio-Tech Co., Ltd. ("Liferiver") Monkeypox Virus Real Time PCR Kit 10. Perkin Elmer Pkmp Monkeypox Virus RT-PCR RUO Kit 11. TIB Molbiol LightMix Modular Orthopoxor Monkeypox Virus 	<p>Farmalikes : https://infoalkes.kemkes.go.id/home/cari/fm/Cari E-Catalog-1.KPP</p>



<https://doi.org/10.1016/j.jviro.2010.07.012>Get rights and content



Skema Primer dan Probe In House



<https://doi.org/10.1016/j.jviro.2010.07.012>Get rights and content



COMMERCIAL KIT VS IN HOUSE PROCEDURE

Commercial Kit	In House Prosedur
Verifikasi sebelum digunakan	Optimasi : uji sensitivitas dan uji spesifitas), komposisi, protokol
Mahal	Murah
Distributor terbatas	distributor banyak
Praktis (<i>user friendly</i>)	<i>Basic knowledge</i>

PERSIAPAN EKSTRAKSI DNA

PENANGANAN SPESIMEN SUSPECT MPOX

- Penanganan spesimen suspect Mpx dilakukan di **BSL-2**
- Manipulasi spesimen harus dilakukan di **BSC Class II** yang tersertifikasi
- Menggunakan **APD** yang sesuai
- Menggunakan **centrifuge dengan rotor tertutup**
- Dekontaminasi menggunakan **Hypochlorite 0,5%**
- Petugas laboratorium sebaiknya sudah **vaksinasi**



13

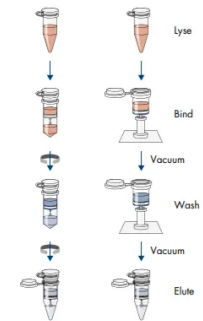
EKSTRAKSI DNA (1)

TUJUAN :

1. Melepaskan asam nukleat dari sel
2. Memperoleh asam nukleat yang murni (bebas kontaminasi protein, karbohidrat maupun lemak)

PRINSIP KERJA :

- Memecah/ melisiskan jaringan atau sel
- Binding
- Washing
- Elusi



14

EKSTRAKSI DNA (2)

DNA extraction kit :

- **QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen)**
- **Magmax total nucleic acid extraction kit**

CARA KERJA :

Ikuti instruksi kerja dari Kit

1. Masukkan Pretensee K 20 µl, ke dalam 1,5 ml screwcap tube
2. Tambahkan 200 µl spesimen
3. Tambahkan 200 µl Buffer A1
4. Vortex selama kurang lebih 15 detik
5. Simpan di suhu 50°C, selama 10 menit, spin down beberapa detik
6. Tambahkan 200 µl Ethanol (96-100%)
7. Vortex selama 15 detik, kemudia spin down
8. Transfer semua larutan ke dalam spin column
9. Sentrifuse 8000 rpm selama 1 menit
10. Buang supernatan, ganti collection tube
11. Tambahkan 500 µl Buffer AW1
12. Sentrifuse 8000 rpm selama 1 menit
13. Buang supernatan, ganti collection tube
14. Tambahkan lagi 700 µl Buffer AW2
15. Sentrifuse 14000 rpm selama 2 menit
16. Buang supernatan, pasang kembali collection tube yang sama
17. Sentrifuse 14000 rpm selama 1 menit
18. Ganti collection tube dengan 1,5 ml screwcap tube
19. Tambahkan 50 µl Buffer AF
20. Dukung dalam suhu ruang (RT) selama 1 menit
21. Sentrifuse 8000 rpm selama 1 menit
22. Buang spin column dan beri label pada tube



15

Real Time PCR MPXV

CARA KERJA

RT-PCR yang menggunakan **SuperScript™ III Platinum™ qRT-PCR Kit (Invitrogen)** atau **Tunderbird PCR Kit (Toyobo)**

Komponen	1 reaksi (µl)
Nuclease free water	3
2x PCR Reaction Mix	10
Primer RG2 G F (40 µM)	0.5
Primer RG2 G R (40 µM)	0.5
Probe RG2 G (10 µM)	0.5
DNA Polimerase	0.5
total	15 µl

Assay	Primer / Probe Sequences	Temp (°C)	Time (sec)	Cycles
Monkeypox virus Generic	Forward 5'-GGA AAA TGT AAA GAC AAC GAA TAC AG-3'	95	20	1
	Reverse 5'-GCT ATC ACA TAA TCT GGA AGC GTA-3'	95	3	
	Probe 5'-FAM-AGG CCG TAA TCT A-BHQ1-Let-3-GT TGT CTA TCG TGT CC-Spacer-CE-3'	60	30	40
Human DNA (e.g., RNase P)	Forward 5'-AGA TTT GGA CCT GGG AGC G-3'	95	20	1
	Reverse 5'-GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT-3'	95	3	
	Probe 5'-FAM-TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG-BHQ1-3'	60	30	40

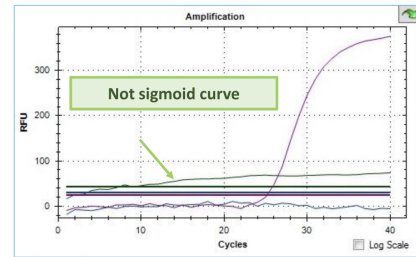
16

INTERPRETASI HASIL

- Hasil NC harus negatif dan tidak menunjukkan kurva amplifikasi
- Hasil PC menunjukkan kurva amplifikasi (sigmoid) dengan rentang kisaran nilai CT diantara 25 - 30
- Hasil positif ditandai dengan adanya kurva amplifikasi (sigmoid) dengan nilai CT berdasarkan prosedur reagensia atau kit yang digunakan

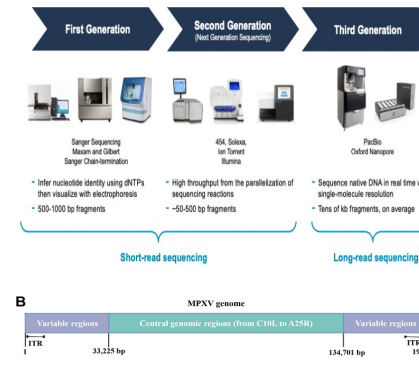
Kontrol Kualitas :		
Tipe	Hasil Real Time PCR GR2 G	Fungsi
Positive Control (PC)	+	Mengontrol kinerja reagensia (enzim, primer, probe)
Negative Control (NC)	-	Mengontrol kinerja kontaminasi reagensia dan lingkungan
Kontrol RP	+	Mengontrol kinerja ekstraksi RNA dan kemungkinan kontaminasi

Kesimpulan Hasil :		
Nilai CT	RP	Kesimpulan Hasil
GR2 G	RP	
< 40	< 40 / NA	Positif Monkeypox Virus
NA	< 40	Negatif Monkeypox Virus
NA	NA	Tidak Valid



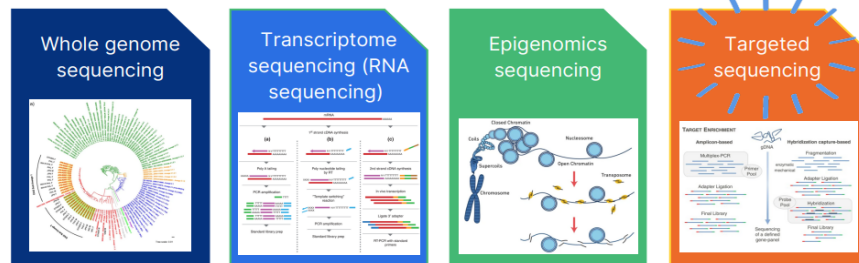
WHOLE GENOME SEQUENCING

Sequensing adalah proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA



Instrument	Advantages	Limitations	Instrument run time	Sequencing throughput	Relative availability and cost
Sanger sequencing	Widely accessible Easy to use Cost-effective sequencing if few targets required	Very low throughput Amplification often no more than 1000 bp must be individually amplified and sequenced Expensive for full genomes Inappropriate for metagenomics	Typically a few hours	100 kb-2 Mb per single run	Widely available Relatively low cost for a few targets
Illumina (e.g. HiSeq, MiSeq, NextSeq, HiSeq, NovaSeq)	Very high sequencing yields possible Very high accuracy Seq is portable Methods for handling data are well established	With the exception of Illumina iSeq, expensive to purchase and maintain compared with some other platforms Maximum read length 2 x 300 bp	10-55 h, depending on the instrument	1.2-6000 Gb, depending on instrument	High maintenance and start-up costs Moderate running costs
Oxford Nanopore Technologies (Flongle, MinION, GridION, PromethION)	Portable, direct sequencing Real-time data Low start-up and maintenance costs Can stop sequencing as soon as sufficient data are achieved Very long read lengths achievable (exceeding the full length of the SARS-CoV-2 genome)	Challenges with homopolymers Error rate per read is ~5% (RS4 Flongle) so use of appropriate systems is critical to obtain high-accuracy consensus sequences Currently unsuitable for determining intra-host variation unless replicate sequencing is used (1/2)	Results available immediately Can be monitored and run for up to several days as required Up to 48 flow cells can be used on PromethION	Ranging from <2 GB for Flongle flow cell to 225 Gb for PromethION flow cell	No maintenance and low start-up costs Moderate running costs
Ion Torrent	Fast turnaround once sequencing starts	Challenges with homopolymers Expensive to purchase Maximum typical read lengths around 400 bp	2 h-1 day, depending on chip and device	30 kb-300b depending on device and chips	Moderate costs.

METODA NEXT GENERATION SEQUENCING



pengurutan genom lengkap/proses menentukan urutan DNA lengkap dari suatu organisme pada satu waktu.

- Metagenomic
- Shot Gun Sequencing

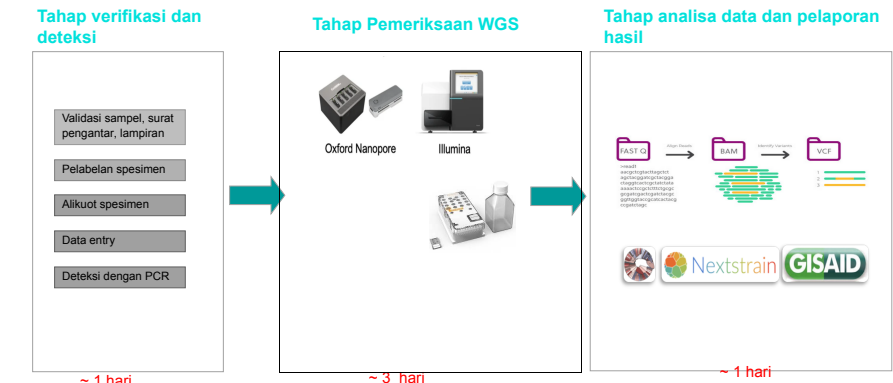
- Mengidentifikasi keberadaan dan jumlah RNA dalam sampel biologis pada saat tertentu, menganalisis transkriptom seluler
- Mempelajari kemampuan proses gen transkripsi, modifikasi pasca-transkripsi, fusi gen, mutasi/SNP dan perubahan ekspresi gen dari waktu ke waktu, atau perbedaan ekspresi gen

Sequensing untuk mempelajari perubahan dalam metilasi DNA, interaksi DNA-protein, aksesibilitas kromatin, modifikasi histon

sequensing gen untuk menganalisis mutasi spesifik dalam sampel tertentu, fokus berisi satu set gen atau daerah gen terpilih yang telah diketahui atau diduga terkait dengan penyakit atau fenotipe yang sedang dipelajari.



ALUR KERJA Pengerjaan WGS di LABORATORIUM



Gohi, et al. *BMC Genomics* 21, 863 (2020).



TAHAP PERSIAPAN PELAKSANAAN TAHAPAN WGS



21

WHOLE GENOME SEQUENCING UNTUK VIRUS MPox

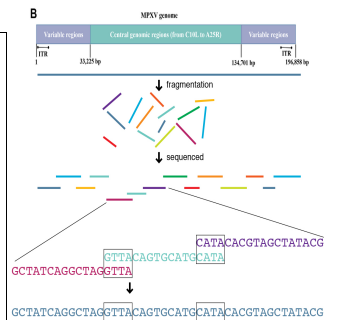
Menggunakan metoda Next Generation Sequencing :

Metagenomic

- Mendeteksi semua genom pathogen dalam suatu spesimen
- Data yang dihasilkan sangat besar, karena semua genom teridentifikasi
- Memerlukan analisa bioinformatics mendalam
- Memerlukan mesin NGS lebih advance
- Menentukan keseluruhan urutan basa nukleotida virus Mpox sepanjang kurang lebih 190 kb

Targeted sekuensing

- Fokus pada spesifik patogen
- Mendeteksi varian yang baru atau sudah diketahui dengan gen interest tertentu
- Data yang dihasilkan lebih sedikit sehingga bisa dilakukan dalam skala lab yang tidak terlalu besar
- Menentukan keseluruhan urutan basa nukleotida virus Mpox sepanjang kurang lebih 190 kb



22

TAHAP PEMERIKSAAN WGS

Sampel klinis

Ekstraksi DNA

Amplifikasi DNA*

Preparasi Librari

Kuantifikasi dan pooling librari

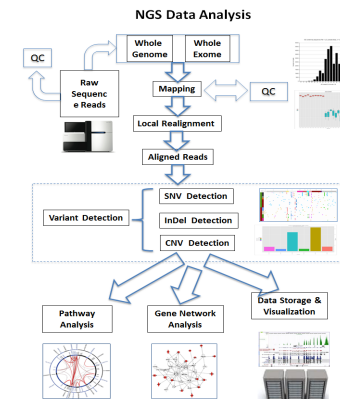
Sekuensing

Analisa data



23

TAHAP INTERPRETASI HASIL : ANALISA DATA



Analisa Upstream :

- Teknis Lab
- Platform yang digunakan
- QC/QA

Analisa Downstream :

- hipotesa
- epidemiologi, klinis, dll

Sumber gambar modifikasi : illumina

Sumber : <https://genomehubcam.wordpress.com/>



24

Ringkasan

- **Mpox** (sebelumnya dikenal dengan nama monkeypox) merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh **Virus Monkeypox (MPXV)**
- Deteksi adanya MPVX dilakukan dengan metoda NAAT, berupa real time PCR atau konvensional PCR
- Deteksi membedakan MPXV Clade 1 dan Clade 2 dilakukan dengan PCR atau Whole Genome Sequencing
- Menbedakan Sub-Clade Ia, Ib, Iia, Iib dilakukan dengan Whole Genome Sequencing
- Penentuan hasil laboratorium didukung dengan data klinis dan epidemiologi

