

ISSN 0216-6461

e-ISSN 2354-6832

Terakreditasi LIPI

Sertifikat Nomor: 446/AU2/P2MI-LIPI/08/2012

WARTAZOA

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

Volume 25

Nomor 2

Juni 2015



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

WARTAZOA

Buletin Ilmu Peternakan dan Kesehatan Hewan Indonesia

Volume 25 Nomor 2 Tahun 2015

ISSN 0216-6461

e-ISSN 2354-6832

Terakreditasi LIPI

Sertifikat Nomor 446/AU2/P2MI-LIPI/08/2012
(SK Kepala LIPI No. 742/E/2012)

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 Utama – Balai Penelitian Ternak – Pakan dan Nutrisi Ternak)

Wakil Ketua:

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

Anggota:

Prof. (Riset) Dr. Ir. Budi Haryanto, MSc. (Peneliti Utama – Balai Penelitian Ternak – Pakan dan Nutrisi Ternak)

Dr. Ir. Chalid Talib, MSc. (Peneliti Utama – Balai Penelitian Ternak – Pemuliaan dan Genetika Ternak)

Dr. Ir. Atien Priyanti SP, MSc. (Peneliti Utama – Puslitbangnak – Ekonomi Pertanian)

Drh. Indrawati Sendow, MSc. (Peneliti Utama – Balai Besar Penelitian Veteriner – Virologi)

Dr. Nurhayati (Peneliti Madya – Balai Penelitian Ternak – Budidaya Tanaman)

Ir. Tati Herawati, MAgr. (Peneliti Madya – Balai Penelitian Ternak – Sistem Usaha Pertanian)

Dr. Wisri Puastuti, SPt., MSi. (Peneliti Madya – Balai Penelitian Ternak – Pakan dan Nutrisi Ternak)

Dr. Drh. Eny Martindah, MSc. (Peneliti Madya – Balai Besar Penelitian Veteriner – Parasitologi dan Epidemiologi)

Dr. Drh. NLP Indi Dharmayanti, MSi. (Peneliti Madya – Balai Besar Penelitian Veteriner – Virologi)

Mitra Bestari:

Prof. Dr. Ir. Tjeppey D Soedjana, MSc. (Ekonomi Pertanian – Puslitbangnak)

Prof. Dr. Edy Rianto, MSc. (Ilmu Ternak Potong dan Kerja – Univ. Diponegoro)

Prof. Dr. Gono Semiadi (Pengelolaan Satwa Liar – LIPI)

Dr. Agr. Asep Anang, MPhil. (Pemuliaan Ternak – Univ. Padjadjaran)

Penyunting Pelaksana:

Linda Yunia, SE

Pringo Pandu Kusumo, AMd.

Irfan R Hidayat, SPt.

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

Infeksi Subklinis *Avian Influenza* H5N1 pada Peternakan Ayam yang Menerapkan Program Vaksinasi

Simson Tarigan

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
simson.tarigan@yahoo.co.id

(Diterima 6 November 2014 – Direvisi 2 Maret 2015 – Disetujui 29 April 2015)

ABSTRAK

Penyakit *Avian Influenza* H5N1 telah tersebar hampir di seluruh Indonesia dan masih terjadi sampai sekarang, terutama pada unggas sektor-4 yang biasanya tidak divaksin. Mengingat vaksinasi terhadap virus Influenza tidak menghasilkan *sterilizing immunity* dan sumber infeksi masih tersebar di sekitar peternakan, infeksi pada ayam petelur komersial dan pembibitan kemungkinan masih sering terjadi. Karena infeksi pada ayam yang sudah divaksinasi bersifat subklinis, keberadaannya tidak diketahui oleh pemilik atau petugas kandang. Virus terus menerus bersirkulasi pada peternakan tersebut dan merupakan sumber penularan yang laten bagi daerah sekitarnya. Alat uji yang praktis untuk mendeteksi infeksi subklinis pada peternakan ayam yang menerapkan program vaksinasi, yang dikenal sebagai metode *Differentiation Infected from Vaccinated Animals* (DIVA), belum tersedia di Indonesia. Penempatan ayam sentinel merupakan cara yang sangat sensitif, akurat dan paling sering dipakai, namun berisiko pada *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) H5N1. Metode DIVA berbasis neuraminidase heterologus pernah diaplikasikan dengan hasil yang memuaskan di Italia, tetapi metode ini sulit diterapkan di Indonesia. Metode DIVA berbasis *Ectodomain* protein M2 virus Influenza (M2e) yaitu menggunakan antibodi terhadap M2e sebagai penanda infeksi, tidak membatasi jenis subtype vaksin yang harus digunakan. Metode DIVA berbasis M2e ini mempunyai prospek yang sangat baik karena M2e merupakan domain yang sangat *conserved* untuk semua virus *Avian Influenza* dan proporsi ayam yang *seroconverted* terhadap M2e setelah infeksi cukup tinggi.

Kata kunci: *Avian Influenza* H5N1, metode DIVA, neuraminidase heterologus, M2e, vaksinasi

ABSTRACT

Subclinical Infection by Avian Influenza H5N1 Virus in Vaccinated Poultry

Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) H5N1 is endemic in Indonesia especially in unvaccinated sector-4 poultry. Considering that vaccination against influenza viruses does not induce sterilizing immunity and the source of infection is prevalent around the vaccinated farms, infection in the commercial layers and breeders may be common. Because infection in vaccinated birds is usually subclinical, its presence is unnoticeable. The virus in such farms may be circulated persistently and become the source of infection to the surrounding areas. The test, *Differentiation Infected from Vaccinated Animals* (DIVA) that can be used to identify subclinically infected farms is not available yet in Indonesia. Observation on sentinel chicken among vaccinated birds is a sensitive and accurate method but unsafe for HPAI. The DIVA method based on heterologous neuraminidase has been successfully used in Italy, but it is difficult to be applied in Indonesia. The DIVA method based on *Ectodomain* protein M2 virus Influenza (M2e) uses antibody against M2e as infection marker and does not limit the subtype of vaccine used. This method is potential to be used in Indonesia because the M2e is very conserved across all avian influenza viruses and has high proportion of post-infected seroconverted birds.

Key words: H5N1, DIVA method, heterologous neuraminidase, M2e, vaccination

PENDAHULUAN

Penyakit *Avian Influenza* (AI) telah menimbulkan korban jiwa, ketakutan pada masyarakat dan kerugian ekonomi yang sangat besar bagi sektor perunggasan nasional. Sampai bulan Januari 2015, terdapat 197 kasus dikonfirmasi terinfeksi virus H5N1 pada manusia di Indonesia, 165 diantaranya fatal (Sekjen Kemenkes 2015). Kerugian ekonomi selama dua tahun saja (2004-2006) ditaksir mencapai Rp. 4,1 triliun (Kompas 2008).

Usaha pemerintah untuk menanggulanginya juga dilakukan dengan serius, yakni membentuk Komite Nasional Flu Burung dan Kesiapsiagaan Menghadapi Pandemi Influenza (Komnas FBPI) yang melibatkan sejumlah kementerian dan lembaga negara. Pada pertengahan tahun 2004, pemerintah mengusahakan vaksinasi massal untuk semua unggas di Indonesia. Pelaksanaan vaksinasi pada unggas sektor-4 dilakukan oleh pemerintah, sedangkan peternakan petelur komersial dan pembibitan oleh swasta atau pemilik

usaha. Karena kesulitan logistik, vaksinasi pada unggas sektor-4 dan ayam pedaging komersial tidak dilakukan lagi sejak tahun 2008, sedangkan pada ayam petelur dan pembibitan vaksinasi ketat dan rutin masih dilakukan sampai saat ini. Karena tidak divaksin, kejadian penyakit pada unggas sektor-4 masih terus dilaporkan hampir setiap bulannya, walaupun jumlahnya tidak setinggi sebelumnya (Nurhayati 2014). Wabah yang terjadi pada unggas sektor-4 kemungkinan menjadi sumber penularan bagi peternakan ayam petelur komersial dan pembibitan. Infeksi pada peternakan yang menerapkan vaksinasi biasanya tidak menimbulkan kematian dan gejala klinis sehingga infeksi subklinis atau *silent infection* bisa berlangsung terus tanpa diketahui (Capua et al. 2003). Peternakan dengan infeksi subklinis seperti ini merupakan sumber infeksi bagi daerah sekitarnya, terutama ayam buras dan broiler yang tidak divaksin. Sampai saat ini, belum terlihat usaha untuk mengatasi infeksi subklinis tersebut. Tulisan ini membahas mengapa infeksi subklinis AI terjadi pada ayam yang sudah divaksin dan metode yang bisa dipakai untuk mengenalinya.

PENERAPAN PROGRAM VAKSINASI PADA UNGGAS DI INDONESIA

Pada tahun 2003, terjadi wabah penyakit pada unggas di Indonesia dan beberapa negara-negara Asia Timur dan Tenggara, dengan tingkat penularan yang sangat cepat dan kematian yang sangat tinggi. Pada akhir tahun 2003 penyebab penyakit tersebut dikonfirmasi sebagai virus Influenza subtype H5N1, sama dengan di negara-negara Asia lain (Damayanti et al. 2004; Dharmayanti et al. 2004). Deklarasi resmi pemerintah Indonesia dikeluarkan beberapa bulan kemudian (SK Mentan. No. 96/Kpts/PD.620/2/2004), dan pada saat dideklarasikan penyakit telah tersebar di sembilan provinsi. Hanya dalam waktu sekitar dua tahun sejak keberadaannya dikonfirmasi, penyakit telah tersebar di 23 provinsi, 151 kabupaten atau kota dan menimbulkan kematian sekitar 10,45 juta ekor ayam (Basuno 2008).

Berbagai negara seperti Jepang, Malaysia dan Korea Selatan berhasil memberantas *Avian Influenza* H5N1 dengan *stamping out* (FAO 2011). Pada saat Pemerintah Republik Indonesia mendeklarasikan keberadaan virus H5N1, wabah sudah tersebar luas sehingga pengendaliannya tidak memungkinkan lagi dengan hanya *stamping out*. *Stamping out* adalah pemusnahan semua unggas yang terinfeksi atau kemungkinan terinfeksi dan diikuti dengan monitoring perkembangan penyakit dengan teliti, merupakan prosedur standar yang dianjurkan dalam pemberantasan penyakit menular sebelum penyakit menyebar secara luas. Oleh karena itu, setelah melalui perundingan dengan berbagai pihak, akhirnya pemerintah

memutuskan untuk menerapkan vaksinasi massal pada unggas. Vaksinasi untuk peternakan ayam pembibitan dan petelur komersial disepakati dilakukan oleh pemilik perusahaan, sedangkan unggas sektor-4 dan peternakan ayam petelur skala kecil dilakukan oleh pemerintah. Vaksinasi di peternakan pembibitan dan petelur komersial sejak program dimulai sampai saat ini berjalan dengan baik dengan cakupan vaksinasi atau *vaccination coverage* mencapai hampir 100% (Siregar et al. 2007).

VAKSINASI AVIAN INFLUENZA PADA UNGGAS SEKTOR-4

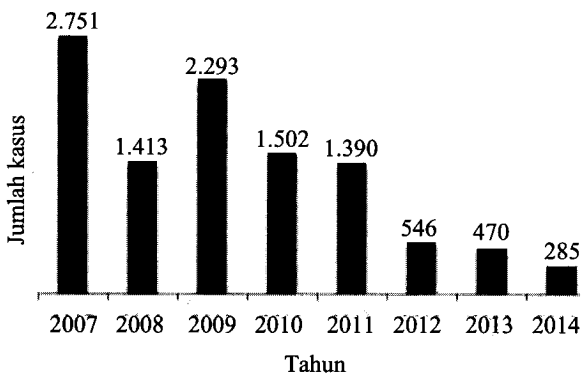
Jumlah unggas sektor-4 pada tahun 2004 yang hendak divaksin ditaksir sebanyak 300 juta ekor. Dengan populasi unggas sebesar itu, waktu hidup unggas rata-rata enam bulan dan vaksinasi dilakukan dua kali setiap ekor, maka total vaksin yang diperlukan adalah 1,2 milyar dosis per tahun (Siregar et al. 2007). Akan tetapi, pemerintah hanya menyediakan 300 juta dosis pada tahun 2004, 214,8 juta dosis tahun 2005, 116,9 juta dosis pada tahun 2006 dan 98,5 juta dosis tahun 2007 (Siregar et al. 2007). Selanjutnya, realisasi penggunaan vaksinasi di lapangan pada kenyataannya hanya setengah dari total yang disediakan (Siregar et al. 2007). Kesulitan pelaksanaan vaksinasi pada unggas sektor-4 mudah dimengerti, mengingat unggas tersebut hidup bebas berkeliaran dan pemilikan per keluarga sangat rendah.

Manfaat vaksinasi terhadap pemberantasan AI dengan cakupan vaksinasi atau *vaccination coverage* serendah itu diragukan manfaatnya. Untuk memperoleh kekebalan populasi yang memadai terhadap virus AI, diperlukan cakupan vaksinasi sekurang-kurangnya 60% (Spackman & Swayne 2013). Disamping kesulitan dalam pelaksanaannya, respon ayam buras terhadap vaksinasi H5N1 juga jauh lebih rendah dibandingkan dengan ayam petelur komersial. Pengukuran titer *hemagglutination inhibition* (HI) setelah *booster* vaksinasi memperlihatkan bahwa persentasi ayam yang dianggap memiliki kekebalan protektif (titer HI ≥ 16) pada ayam buras di berbagai negara hanya berkisar 55-63% (Hinrichs et al. 2009). Bahkan berdasarkan hasil sebuah penelitian operasional di Pulau Jawa yang melibatkan 6.400 sampel unggas sektor-4 menunjukkan bahwa hanya antara 20-40% saja diantara unggas memiliki titer HI ≥ 16 setelah dua kali vaksin (USAID 2009). Selanjutnya, penelitian ini mengungkapkan bahwa untuk memperoleh kekebalan protektif pada unggas sektor-4 diperlukan vaksinasi empat kali setahun dan biaya vaksinasi pada tahun tersebut ditaksir sebesar 0,12 USD (Rp. 1.400) per dosis. Dengan demikian, biaya untuk vaksinasi jauh lebih tinggi dari nilai ekonomi unggasnya itu sendiri (USAID 2009). Mengingat biaya vaksinasi yang

demikian tinggi dan kekebalan yang diperoleh rendah, maka vaksinasi massal pada unggas sektor-4 tidak dilanjutkan.

KASUS *AVIAN INFLUENZA* PADA UNGGAS SEKTOR-4 TERUS BERLANJUT SAMPAI SEKARANG

Salah satu dampak dari kegagalan pelaksanaan vaksinasi pada unggas sektor-4 adalah wabah AI masih berlanjut sampai saat ini, berdasarkan hasil uji cepat (*rapid test*) positif yang dilaporkan tim *Participatory Disease Surveillance and Response* (PDSR) melalui SMS gateway dan *surveillance* investigasi BBV/BV (Gambar 1) (Bouma et al. 2008; Bett et al. 2013; Nurhayati 2014). Berdasarkan jumlah laporan yang masuk ke Direktorat Kesehatan Hewan, penurunan kasus AI terjadi sejak tahun 2011. Penyebab penurunan tersebut tidak diketahui dengan pasti, apakah kasus di lapangan memang benar-benar turun, atau aktivitas *surveillance* yang menurun, atau keduanya. Menghubungkan penurunan kasus tersebut dengan peningkatan program biosekuriti pada unggas sektor-4 juga tidak dapat dibuktikan. Penerapan biosekuriti sampai level yang dapat menurunkan kasus AI secara drastis juga sangat sulit, mengingat sistem pemeliharaan unggas sektor-4 yang sangat tradisional (Conan et al. 2012). Oleh karena itu, sebelum ditemukan cara penanggulangan yang efektif dan *sustainable* pada unggas sektor-4, penyakit AI akan terus menerus endemik di Indonesia dengan intensitas yang belfluktuasi.



Gambar 1. Perkembangan kasus penyakit AI pada unggas di Indonesia dari tahun 2007 sampai 30 September 2014

Sumber: Bouma et al. (2008); Bett et al. (2013); Nurhayati (2014)

DAMPAK WABAH *AVIAN INFLUENZA* PADA UNGGAS SEKTOR-4 TERHADAP UNGGAS SEKTOR-3

Peternakan ayam petelur dan pedaging komersial di Indonesia umumnya terletak tidak jauh dari pinggiran kota-kota besar. Di sekitar peternakan tersebut, terdapat pemukiman dengan penduduk desa, sebagaimana kebiasaan penduduk di pedesaan dan di pinggiran kota pada umumnya, mereka memelihara ayam buras, itik atau entok dengan sistem pemeliharaan dilepas. Pekerja di peternakan komersial tersebut biasanya bermukim di sekitar peternakan. Jadi, sekalipun peternakan komersial memiliki pagar yang dapat mencegah ayam buras di sekitarnya memasuki peternakan, para pekerja dapat bertindak sebagai agen transmisi penyakit. Oleh karena itu, wabah AI yang terjadi di luar peternakan dapat dengan mudah menjalar ke dalam peternakan.

Bila peternakan ayam petelur atau pembibitan yang menerapkan program vaksinasi secara rutin terpapar oleh virus H5N1 maka akan terjadi salah satu dari tiga kemungkinan berikut. Kemungkinan pertama, paparan tidak menimbulkan penyakit klinis dan ayam tidak mengekskresikan virus dalam jumlah yang bisa dideteksi dengan teknik yang sensitif seperti PCR atau isolasi virus (Capua et al. 2003). Kemungkinan ini terjadi apabila ayam memiliki kekebalan protektif yang maksimal karena divaksin dengan vaksin yang mengandung virus yang sesuai atau memiliki kesamaan genetik dengan virus yang sedang menyerang. Kemungkinan ini diperkirakan jarang terjadi karena vaksin yang digunakan jarang yang benar-benar sesuai dengan virus di lapangan. Hal ini akibat sifat virus *Influenza* yang mengalami perubahan genetik atau *antigenic drift* yang relatif cepat dan *update* vaksin dilakukan dalam jangka waktu yang relatif lama dan tidak teratur (Gerdil 2003). Karena cepatnya proses *antigenic drift* maka *update* vaksin *seasonal influenza* pada manusia dilakukan rutin setiap tahun (Gerdil 2003). *Update* sesering itu kelihatannya tidak memungkinkan pada vaksin AI pada unggas dan hewan lain.

Kemungkinan kedua, bila ayam yang telah divaksin terpapar virus H5N1 adalah timbulnya penyakit klinis disertai sekresi virus oleh ayam yang terinfeksi dalam jumlah yang besar dan berakhir dengan kematian. Kemungkinan ini dapat terjadi apabila unggas tidak memiliki kekebalan yang protektif dari virus vaksin yang digunakan tidak sesuai dengan virus penantang. Selain karena ketidakcocokan vaksin,

kejadian seperti ini juga bisa timbul apabila waktu dan cara aplikasi vaksin yang tidak tepat, sehingga tidak terbentuk antibodi dengan titer yang memadai (Kim et al. 2010a). Kejadian seperti ini kemungkinan cepat diketahui penyebabnya karena apabila timbul penyakit dengan mortalitas yang tinggi peternak biasanya berusaha mendatangkan dokter hewan profesional untuk menangani masalah. Setelah diketahui penyebabnya virus AI, tindakan yang diambil peternak adalah segera mengganti vaksin dengan vaksin yang dianggap lebih cocok. Bila kejadian seperti ini meluas, maka kemungkinan besar pemerintah bekerja sama dengan perusahaan produsen vaksin akan secepatnya meng-update vaksin dengan *strain* virus yang sesuai.

Peredaran vaksin komersial yang tidak sesuai dengan antigenik virus yang beredar di lapangan sering terjadi, walaupun vaksin tersebut legal atau teregistrasi. Sebuah pengujian efikasi terhadap vaksin komersial yang beredar di Indonesia memperlihatkan bahwa dua dari tujuh vaksin yang diuji tidak memiliki kecocokan dengan representasi virus lapangan, karena ketika ayam yang sebelumnya divaksin dengan kedua vaksin tersebut ditantang dengan *strain* virus yang dianggap representasi virus yang beredar menyebabkan 70-100% kematian (Indriani et al. 2011). Peredaran vaksin yang tidak sesuai dengan virus yang beredar di lapangan juga telah dilaporkan di Mesir (Grund et al. 2011).

Kemungkinan ketiga, apabila peternakan ayam petelur atau pembibitan terpapar virus H5N1 adalah ayam hanya mengalami infeksi subklinis tetapi mengekskresikan virus ke dalam lingkungan dalam jumlah yang signifikan secara epidemiologis. Kejadian ini akibat kekebalan yang dimiliki cukup untuk melindungi ayam dari penyakit klinis, tetapi virus masih mengalami replikasi pada saluran pencernaan sehingga ayam masih mensekresi virus ke dalam lingkungan. Kejadian seperti ini akibat vaksin yang digunakan hanya memiliki kesamaan genetik parsial dengan virus penantang (Spackman & Swayne 2013). Tingkat kesamaan virus terletak diantara tingkat kesamaan pada kemungkinan pertama dan kedua seperti dijelaskan sebelumnya. Kemungkinan ketiga ini adalah kemungkinan yang paling besar, karena virus vaksin yang digunakan biasanya termasuk dalam kategori kemungkinan ketiga ini (Capua et al. 2003; Jadhao et al. 2009; Abdel-Moneim et al. 2011; Spackman & Swayne 2013).

Ayam yang terinfeksi tidak memperlihatkan gejala klinis sehingga peternak tidak menyadari ayamnya terinfeksi, akibatnya virus bersirkulasi di peternakan dalam waktu yang lama tanpa diketahui. Keberadaan virus di peternakan tersebut baru akan terungkap bila penyakit klinis dan kematian terjadi akibat ketidakcocokan antara virus vaksin dengan virus yang bersirkulasi melebar sedemikian rupa, sehingga kekebalan yang terbentuk tidak dapat melindungi ayam

dari penyakit klinis dan kematian. Selama tidak menimbulkan penyakit klinis dan kematian, peternak kemungkinan tidak mengalami kerugian ekonomis yang berarti, tetapi keberadaan peternakan seperti ini sangat membahayakan bagi daerah sekitarnya, karena merupakan sumber penularan yang laten bagi ayam buras dan broiler yang sangat rentan karena tidak divaksin.

Metode deteksi infeksi subklinis pada peternakan ayam petelur dan pembibitan

Keberadaan peternakan ayam dengan infeksi subklinis virus H5N1 sulit dikenali bukan saja karena tidak adanya tanda-tanda klinis, tetapi juga akibat ketidakadaan alat diagnosis yang bisa dipakai untuk mendeteksinya. Alat diagnosis serologis seperti uji *hemagglutination inhibition* (HI), *agar gel precipitation test* (AGPT) atau *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) antibodi tidak bisa digunakan, karena tidak bisa membedakan seropositivitas akibat vaksinasi atau infeksi. Tes yang digunakan untuk mendeteksi virus atau komponennya seperti isolasi virus atau PCR sangat tidak praktis, karena jumlah sampel yang harus diperiksa untuk menetapkan suatu *flock* terinfeksi atau tidak sangat banyak akibat absennya indikasi yang dapat dipakai untuk menduga ayam yang terinfeksi. Disamping itu, fakta bahwa durasi ekskresi virus oleh ayam yang terinfeksi yang singkat juga mengharuskan pengambilan sampel dalam jumlah yang besar (Indriani et al. 2011).

Adanya infeksi atau sirkulasi virus H5N1 pada peternakan yang menerapkan program vaksinasi dapat dideteksi dengan berbagai cara, antara lain (1) Penempatan ayam sentinel yang peka; (2) Penggunaan vaksin subunit atau rekombinan hemagglutinin (HA5); (3) Penggunaan vaksin neuraminidase heterologus; (4) Deteksi antibodi protein NS1; dan (5) Deteksi antibodi M2e.

Penempatan ayam sentinel

Metode sentinel dilakukan dengan cara menempatkan sekitar 20 ekor ayam yang tidak divaksin terhadap *Avian Influenza* (AI) secara random di tengah tengah flock ayam yang divaksin (Suarez 2005). Jika ayam menunjukkan gejala klinis, ulas trakhea atau kloaka diambil untuk deteksi virus atau komponennya dengan mengisolasi virus atau PCR. Sebaliknya, jika tidak timbul gejala klinis, serum dari ayam sentinel diambil untuk pemeriksaan antibodi terhadap virus Influenza. Terbetuknya antibodi terhadap virus AI pada ayam ini menunjukkan adanya virus AI bersirkulasi pada *flock* tersebut. Metode sentinel ini sangat sensitif dan spesifik, akan tetapi mempunyai risiko tinggi untuk diterapkan pada *highly pathogenic*

avian influenza (HPAI) seperti virus H5N1. Bahkan, teknik sentinel ini lebih sensitif dibandingkan dengan PCR dan isolasi virus (Capua et al. 2003).

Metode sentinel adalah metode yang paling banyak dipakai. Sebuah survei yang dilakukan pada tahun 2011 terhadap negara-negara anggota OIE, mengungkapkan bahwa 16 diantara 30 negara yang menerapkan vaksinasi terhadap HPAI atau LPAI melakukan monitoring kejadian infeksi pada unggas yang telah divaksin. Sebagian besar (14 negara) menggunakan metode sentinel dan monitoring infeksi pada unggas sentinel dilakukan dengan pengamatan gejala klinis, isolasi virus atau tes serologis (Swayne et al. 2011).

Vaksin hemagglutinin subunit atau rekombinan

Pada infeksi virus Influenza, antibodi terbentuk terhadap berbagai komponen atau protein virus, tetapi antibodi terhadap glikoprotein membran, hemagglutinin, merupakan antibodi yang paling bertanggung jawab terhadap proteksi. Imunisasi dengan hanya hemagglutinin tanpa protein virus yang lain, mampu melindungi hewan atau unggas terhadap infeksi virus Influenza dengan hemagglutinin yang sama (Swayne 2006). Pengenalan atau monitoring adanya infeksi diantara ayam-ayam yang divaksin dengan vaksin subunit hemagglutinin dapat dengan mudah dilakukan dengan mendeteksi antibodi terhadap protein virus yang lain, seperti protein matriks atau nukleoprotein dengan teknik AGP atau ELISA (Suarez 2005).

Vaksin AI rekombinan menggunakan vektor virus Fowlpox yang mengekspresikan hemagglutinin H5 dari A/turkey/Ireland/1378/83 (H5N8) telah dipakai secara luas di Amerika Tengah sejak tahun 1998 untuk pengendalian AI H5N2. Vaksin tersebut juga telah dibuktikan efektif terhadap HPAI H5N1 berdasarkan uji tantangan (*vaccination challenge experiment*) menggunakan isolat HPAI A/chicken/South Korea/ES/03 (H5N1) dan A/chicken/Vietnam/0008/20040 (H5N1) (Bublott et al. 2006; 2007; 2010). Di Amerika Serikat, vaksin Fowlpox-H5 rekombinan (TROVAC AIV H5) telah mendapatkan lisensi untuk dipakai dalam keadaan darurat, *emergency vaccination* (Lambe 2012).

Vaksin Fowlpox-H5 rekombinan atau sejenisnya tidak digunakan di Indonesia, karena sesuai surat edaran Direktur Peternakan dan Kesehatan hewan tanggal 13 Juli 2011 pemerintah telah menetapkan bahwa semua vaksin H5N1 di Indonesia harus menggunakan vaksin yang berasal dari *master seed* salah satu isolat lokal (A/Chicken/West Java/PWT-WIJ/2006, A/Chicken/Pekalongan/BBVW-208/2007, A/Chicken/Garut/BBVW-233/2007, dan A/Chicken/West Java (Nagrak)/30/2007) (IVM Online 2014). Selagi keputusan ini masih diberlakukan, maka *differentiation infected from vaccinated animals*

(DIVA) yang berbasis vaksin hemagglutinin rekombinan menjadi tidak relevan di Indonesia.

Neuraminidase heterologus

Strategi ini meliputi penggunaan vaksin yang mengandung subtipe virus yang mengandung neuraminidase berbeda atau heterolog, tetapi hemagglutinin yang sama atau homolog dengan virus yang beredar di lapangan. Antibodi terhadap neuraminidase virus yang beredar dipakai sebagai penanda adanya infeksi pada ayam yang sudah divaksin. Strategi DIVA neuraminidase heterolog mengabaikan peranan neuraminidase virus vaksin. Sekalipun antibodi terhadap neuraminidase berperan dalam mengurangi keparahan penyakit, tetapi yang terutama bertanggung jawab terhadap proteksi serangan virus penantang, sebagaimana yang telah diuraikan di atas adalah antibodi terhadap hemagglutinin (Johansson et al. 1989).

Strategi DIVA neuraminidase heterolog pertama sekali dikembangkan di Italia pada awal tahun 2000-an ketika terjadi wabah AI H7N1 di bagian Timur Laut negeri itu. Penggunaan vaksin dalam pengendalian penyakit tidak dapat dihindarkan, karena penyakit menyebar dengan sangat cepat. Risiko yang harus ditanggung dengan program vaksinasi ini sangat besar karena Italia tidak diperkenankan mengekspor produk unggasnya ke negara lain di Eropa, kecuali bila negara itu dapat meyakinkan negara pengimpor bahwa antibodi yang dimiliki unggas yang diekspor adalah akibat vaksinasi dengan vaksin inaktif dan yang dapat dibuktikan dengan pengujian dengan alat diagnosis yang secara akurat dapat membedakan seropositivitas pada unggas akibat vaksinasi atau infeksi (Capua et al. 2003; 2004). Untuk mengatasi persoalan tersebut, dikembangkanlah sistem DIVA dengan strategi sebagai berikut, vaksin yang digunakan adalah vaksin inaktif virus A/ck/Pakistan/95 (H7N3). Antibodi terhadap neuraminidase virus lapang (N1) dipakai sebagai penanda infeksi yang dideteksi dengan teknik *indirect fluorescence antibody technique* (iFat) menggunakan rekombinan antigen N1 yang diekspresikan sel eukariotik. Strategi DIVA neuraminidase heterologus ini terbukti efektif, karena vaksinasi dengan vaksin heterologus neuraminidase memberikan proteksi yang memuaskan (93%) dan alat DIVA yang didasarkan pada deteksi antibodi terhadap N1 sangat akurat yang ditunjukkan dengan sensitivitas dan spesifitas masing-masing mendekati 100% (Cattoli et al. 2006).

Tidak lama setelah H7N1 mulai dapat dikendalikan di Italia, wabah virus Influenza subtipe lain, H7N3, terjadi pada kalkun tahun 2002-2003. Strategi DIVA neuraminidase heterologus kembali diterapkan, kali ini vaksin yang digunakan berasal dari virus H7N1 dan antibodi terhadap neuraminidase N3 digunakan sebagai penanda infeksi (Cattoli et al. 2006).

Prasyarat penerapan DIVA neuraminidase heterologus adalah keharusan menggunakan vaksin yang mempunyai neuraminidase yang berbeda dengan virus yang beredar dan virus yang bersirkulasi hanya satu subtype saja. Persyaratan ini sulit dipenuhi karena pemilik usaha peternak tidak bisa dipaksakan menggunakan suatu vaksin apabila mereka tidak yakin kecocokan vaksin tersebut. Pemerintah Indonesia pernah berencana menerapkan strategi DIVA neuraminidase heterologus pada tahun 2007. Untuk tujuan tersebut, pemerintah mengeluarkan kebijakan untuk menggunakan vaksin neuraminidase heterologus (H5N2 dan H5N9) di seluruh Indonesia (Antara News 2007). Kebijakan tersebut tidak dapat dipertahankan, karena besarnya penolakan dari sebagian pelaku industri perunggasan, dimana vaksin heterolog tersebut dianggap kurang memberikan proteksi (Sudarisman 2006; Indriani et al. 2011). Selain itu, persyaratan bahwa hanya satu subtype H5N1 saja yang beredar di Indonesia sulit dipastikan. Selain kesulitan memenuhi persyaratan di atas, alat diagnosis untuk mendeteksi antibodi terhadap neuraminidase N1 sebagai penanda infeksi juga tidak tersedia. Alat uji iFAT yang dipakai di Italia adalah alat uji yang kompleks dan tidak tersedia secara komersial (Capua et al. 2003). Menyiapkan dan memelihara kultur sel eukariotik yang mengekspresikan rekombinan neuraminidase mahal, membutuhkan fasilitas dan keterampilan khusus. Pembacaan hasil *immunofluorescence* bersifat subjektif dan menyita waktu (*time consuming*) dan jumlah sampel yang dapat diperiksa oleh seseorang juga sangat terbatas. Untuk mengatasi persoalan tersebut, berbagai alat uji yang lebih praktis mulai dikembangkan. Salah satu alat uji yang banyak mendapat perhatian adalah *neuraminidase inhibition test* menggunakan fluorokrom MUN (2'-[4-methylumbelliferyl]- α -D-N-acetylneuraminic acid sodium salt hydrate) sebagai substrat. Berdasarkan hasil penggunaan untuk deteksi antibodi terhadap neuraminidase N2 pada ayam yang diinfeksi dengan virus H5N2 terungkap bahwa tes ini praktis, jauh lebih praktis dibandingkan dengan iFAT, pelaksanaan tes hanya membutuhkan tiga jam dan hasilnya semi kuantitatif (Avellaneda et al. 2010b). Akan tetapi, berbeda dengan iFAT sensitivitas dan spesifitas tes ini untuk kondisi lapangan belum tersedia.

Kesimpulan yang sama bahwa metode MUN-*neuraminidase inhibition test assay* sangat sensitif dan spesifik untuk mendeteksi antibodi terhadap neuraminidase, dilaporkan dalam penelitian yang lain (Jadhao et al. 2009). Bahkan diperlihatkan lebih jauh bahwa antibodi terhadap N1 dapat dideteksi pada semua (100%) ayam sepuluh hari setelah infeksi dengan virus H5N1, baik ayam yang sebelumnya divaksin dengan vaksin yang mengandung hemagglutinin yang 100% sesuai atau berbeda cukup jauh dengan virus penantang. Dengan kata lain antibodi terhadap N1

dapat dideteksi, sekalipun replikasi virus H5N1 pada ayam tersebut sangat terbatas.

Sekalipun MUN-*neuraminidase inhibition test* merupakan uji yang akurat, tes ini membutuhkan UV-compatible-microtiter plate, microplate reader yang khusus untuk *fluorometry* dan substrat MUN yang mahal. Usaha mengembangkan ELISA yang diharapkan lebih praktis dan ekonomis telah dilakukan. Salah satu yang relevan untuk Indonesia adalah ELISA untuk deteksi antibodi terhadap neuraminidase N1, karena neuraminidase rekombinan yang dipakai sebagai *coating antigen* berasal dari isolat H5N1 Indonesia, A/ck/Indonesia/PA7/2003 (H5N1) (Liu et al. 2010). ELISA ini mampu mendeteksi antibodi N1 pada ayam yang terinfeksi virus HPAI H5N1 setelah sebelumnya divaksin dengan vaksin inaktif H5N2 atau H5N9.

Strategi DIVA neuraminidase heterologus dengan teknologi yang lebih maju yakni penggunaan vaksin heterologus neuraminidase bukan dari isolat alami, tetapi menggunakan teknologi *reverse genetic* juga telah dilaporkan. Untuk mengendalikan wabah H9N2, di Korea Selatan dikembangkan vaksin H9N1 *reverse genetic*. Teknologi ini memungkinkan mengembangkan vaksin yang mengandung virus dengan hemagglutinin yang identik dengan virus lapang (Kwon et al. 2009). Tes DIVA yang dikembangkan adalah *indirect* ELISA antibodi menggunakan *coating antigen* berupa rekombinan protein N2 yang diproduksi dengan sistem ekspresi *Baculovirus*. Validasi ELISA pada serum dan uji vaksinasi dan tantang memperlihatkan bahwa akurasi ELISA yang dikembangkan memuaskan karena mempunyai sensitivitas dan spesifitas di atas 95% (Kwon et al. 2009).

Salah satu kelemahan strategi DIVA neuraminidase heterologus adalah neuraminidase virus vaksin dan virus yang beredar harus berbeda dan ini sering tidak dapat dijamin. Sebagai contoh, di Indonesia sampai saat ini diasumsikan bahwa virus yang beredar hanya subtype H5N1, tetapi seandainya dikemudian hari muncul virus subtype lain misalnya H5N2, tes DIVA yang didasarkan pada antibodi N1 tidak lagi memadai sebagai penanda infeksi. Salah satu usaha untuk mengatasi kelemahan tersebut adalah penggunaan *reverse genetic* vaksin dengan neuraminidase yang berasal dari virus Influenza tipe B (Peeters et al. 2012). Akan tetapi, pendekatan ini belum memberikan hasil seperti yang diharapkan. Setelah unggas yang sebelumnya divaksin, ditantang dengan virus HPAI H5N1, tidak ada satupun ayam yang *seroconverted* untuk N1, baik pada kelompok unggas yang sebelum ditantang divaksin dengan dosis tinggi (64 HAU), dosis menengah (16 HAU) atau dosis rendah (4 HAU). Penyebab tidak terdeteksinya antibodi N1 tidak diketahui dengan jelas, apakah karena replikasi virus sangat rendah sehingga tidak mampu menggerak pembentukan antibodi, atau alat uji yang

dipakai tidak cukup sensitif. Antibodi terhadap neuraminidase N1 pada penelitian ini diukur dengan ELISA komersial yang tidak jelas sensitivitas dan spesifitasnya.

Strategi DIVA berbasis NS1

Sesuai namanya, protein NS1 adalah protein yang disandi oleh gen virus, tetapi tidak di-*packing* dalam virion atau tidak diperuntukkan sebagai komponen protein patrikel virus. Protein ini diekspresikan dalam jumlah besar oleh sel yang terinfeksi virus, kemudian dideposit pada permukaan membran sel. Protein ini berfungsi memperlancar perjalanan infeksi dengan cara menghambat sintesis inteferon α/β (Cauthen et al. 2007; Tisoncik et al. 2011). Karena protein ini tidak ada dalam virion, maka hewan yang diimunisasi dengan virus inaktif tidak membentuk antibodi terhadap protein NS1. Sebaliknya, hewan yang terinfeksi diharapkan membentuk antibodi terhadap NS1 karena pada permukaan sel yang di dalamnya virus bereplikasi terdapat protein NS1 dalam jumlah yang besar. Atas dasar tersebut, antibodi terhadap protein NS1 dapat dipakai sebagai *marker* pembedaan antara hewan yang seropositif karena infeksi dengan yang seropositif karena vaksinasi (Tumpey et al. 2005; Wang et al. 2011).

Antibodi NS1 dapat dideteksi dengan ELISA menggunakan rekombinan NS1 yang diekspresikan dengan *E. coli* atau peptida sintetik sebagai *coating* antigen. Peptida sintetik yang dapat dipakai sebagai *coating* antigen antara lain peptida dengan urutan asam amino sama dengan urutan asam amino protein NS1 posisi 36-48. ELISA dengan *coating* peptida NS1 36-48 mempunyai spesifitas lebih tinggi tetapi sensitivitas sedikit lebih rendah dibandingkan dengan ELISA dengan *coating* protein NS1 rekombinan (Tumpey et al. 2005).

Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan ELISA NS1 sebagai tes DIVA tidak sesuai dengan yang diharapkan. Pertama, banyak diantara unggas yang telah divaksin dengan vaksin inaktif memiliki antibodi terhadap protein NS1. Antibodi ini diduga terbentuk karena vaksin komersial biasanya mengandung kontaminan protein NS1 yang berasal dari debris sel embrio telur, yakni media propagasi virus dalam pembuatan vaksin (Tumpey et al. 2005). Kedua, titer antibodi NS1 pada unggas yang terinfeksi juga rendah karena NS1 protein memiliki imunogenesitas yang rendah (Tumpey et al. 2005; Avellaneda et al. 2010a).

Peptida sintetik yang merepresentasikan fragmen protein NS1 pada posisi asam amino 219-230, yang digunakan sebagai *coating* antigen ELISA, juga tidak menghasilkan tes DIVA yang lebih sensitif (Dundon & Capua 2009). Hal ini terlihat dari pengujian terhadap

ayam yang diinfeksi dengan virus LPAI H9N2. Antibodi terhadap protein NS1 hanya dapat dideteksi pada tiga dari 14 ekor ayam yang diinfeksi dan itu pun hanya satu hari saja, yakni pada hari ketiga pascainfeksi. Infeksi dengan virus dan cara yang sama pada kalkun menghasilkan proporsi serokonversi yang lebih tinggi tetapi jangka waktu antibodi bisa dideteksi juga masih singkat, yakni hari kelima sampai sepuluh saja (Dundon & Capua 2009).

Salah satu dugaan kuat penyebab rendahnya sensitivitas ELISA NS1 adalah protein NS1 rekombinan atau sintetik peptide yang digunakan sebagai *coating* ELISA mempunyai urutan asam amino yang berbeda dengan NS1 virus penginfeksi. Kecurigaan ini didukung oleh sebuah penelitian yang menggunakan *coating* ELISA dari protein NS1 rekombinan yang *sequence* asam aminonya persis sama dengan protein NS1 virus H9N2 penginfeksi (Zhao et al. 2005). Hasil pemeriksaan dengan ELISA NS1 tersebut di atas memperlihatkan bahwa semua ayam yang diinfeksi dengan virus H9N2 yang sama menjadi *seroconverted*. Antibodi dideteksi dua minggu setelah infeksi dan bertahan sampai lebih delapan minggu. Semua ayam yang tidak diinfeksi seronegatif, baik yang sebelumnya sudah divaksin atau belum divaksin. Sekalipun menjanjikan, hasil penelitian ini sulit diaplikasikan di lapangan karena tidak mungkin menyiapkan ELISA yang *coating* antigennya, protein NS1 rekombinan, mempunyai urutan asam amino persis sama dengan urutan asam amino protein NS1 virus yang beredar di lapangan, mengingat virus Influenza sangat mutagenik.

Sejumlah penelitian yang membandingkan akurasi neuraminidase heterologus dengan ELISA NS1 sebagai tes DIVA menyimpulkan bahwa DIVA berbasis neuraminidase heterologus jauh lebih akurat dibandingkan dengan DIVA berbasis protein NS1 (Avellaneda et al. 2010a; Wang et al. 2011). Hasil survei terhadap negara-negara anggota OIE yang menerapkan strategi DIVA mengungkapkan bahwa tidak ada satu negara pun yang menggunakan tes berbasis protein NS1 sebagai tes DIVA (Swayne et al. 2011).

Strategi DIVA berbasis M2e

Ectodomain protein M2 virus Influenza (M2e) adalah domain eksternal sepanjang 23 asam amino pada bagian *amino terminal* protein M2. Sesuai dengan namanya domain tersebut diposisikan pada bagian eksternal membran virion atau sel yang terinfeksi virus Influenza. *Ectodomain* (M2e) tersebut tersambung dengan domain transmembran sepanjang 12 asam amino dan selanjutnya dengan domain intravirion atau intraselular sepanjang 54 asam amino (Lamb et al. 1985). Berbeda dengan protein NS1 yang tidak terkandung sama sekali dalam virion, protein M2 di-

packing dalam virion sebagai membran protein. Akan tetapi, jumlah protein M2 yang di-*packing* sangat sedikit, yaitu tidak melebihi 70 molekul/virion. Jumlah ini hanya sekitar 5% dari jumlah hemagglutinin dalam virion (Lamb et al. 1985). Akibat jumlahnya yang terlalu sedikit untuk menggertak respon antibodi, hewan yang divaksin dengan virus inaktif diharapkan tidak membentuk antibodi terhadap M2e (Lambrecht et al. 2007; Kim et al. 2010b). Berbeda dengan virion, sel yang terinfeksi virus Influenza mengandung M2e pada permukaan membrannya dalam jumlah yang besar, yaitu setara dengan jumlah hemagglutinin (Lamb et al. 1985). Akibatnya, hewan yang terinfeksi virus Influenza membentuk antibodi M2e (Lambrecht et al. 2007; Kim et al. 2010b).

Sekalipun telah lama dikenal, evaluasi antibodi M2e sebagai penanda infeksi oleh virus influenza baru dilaporkan tahun 2006 (Lambrecht et al. 2007). Potensi antibodi terhadap M2e dapat digunakan sebagai penanda infeksi pada unggas diawali dari hasil pengamatan berikut ini. Ayam atau itik sekalipun sudah divaksin satu atau dua kali, tidak memiliki antibodi terhadap M2e, sama seperti unggas normal yang tidak divaksin. Akan tetapi, bila unggas diinfeksi dengan virus AI, sebagian besar unggas baik yang normal atau sebelumnya sudah divaksin, menjadi *seroconverted* terhadap M2e.

Intensitas infeksi atau replikasi virus dalam tubuh induk semang berbanding lurus dengan intensitas rangsangan M2e terhadap sistem imun dan selanjutnya berbanding lurus dengan titer antibodi M2e yang terbentuk. Pernyataan ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya (Lambrecht et al. 2007; Kim et al. 2010b) bahwa persentase unggas yang *seroconverted* setelah infeksi yang sebelumnya tidak divaksin lebih tinggi dibandingkan pada unggas yang sebelumnya telah divaksin. Pada unggas yang sudah divaksin, titer HI sebelum diinfeksi berbanding terbalik dengan titer M2e setelah infeksi. Replikasi virus pada unggas yang tidak memiliki kekebalan, berlangsung tanpa hambatan sehingga pembentukan antibodi M2e berjalan efisien. Sebaliknya, pada unggas yang memiliki kekebalan, replikasi virus mengalami hambatan yang berdampak pada kurang efisiennya pembentukan antibodi M2e. Berdasarkan interpretasi ini dapat diduga bahwa tidak semua unggas yang terpapar virus Influenza memiliki antibodi terhadap M2e. Unggas yang memiliki kekebalan yang tinggi akibat divaksin dengan vaksin yang sesuai dengan virus yang beredar kemungkinan tidak memiliki antibodi, karena replikasi virus pada unggas tersebut sangat terbatas. Seberapa intensif replikasi virus dalam tubuh unggas yang mampu merangsang pembentukan antibodi M2e tidak diketahui.

Sekalipun tes DIVA berbasis M2e belum digunakan di lapangan, tes ini memiliki potensi yang

sangat besar untuk dikembangkan (Swayne et al. 2011). Protein M2e merupakan protein virus Influenza yang sangat *conserved*, sehingga alat uji yang dikembangkan dapat diaplikasikan secara luas (Liu et al. 2005). Deteksi antibodi terhadap M2e relatif mudah dengan ELISA yang menggunakan *coating* antigen baik berupa peptida sintetik (Lambrecht et al. 2007; Kim et al. 2010b) atau rekombinan M2e (Hemmatzadeh et al. 2013; Hadifar et al. 2014).

KESIMPULAN

Vaksinasi H5N1 pada ayam petelur komersial atau pembibitan tidak dapat dipungkiri memberikan keuntungan ekonomi yang besar karena dapat memberikan perlindungan terhadap penyakit klinis dan kematian. Akan tetapi, vaksinasi tidak mampu memberikan perlindungan terhadap infeksi subklinis. Peternakan yang terinfeksi secara subklinis dapat bertindak sebagai sumber penularan penyakit untuk daerah sekitarnya secara terus menerus karena keberadaannya tidak diketahui. Oleh karena itu, monitoring infeksi subklinis pada peternakan yang menerapkan program vaksinasi sangat penting untuk keberhasilan penanggulangan penyakit di Indonesia. ELISA antibody M2e diharapkan dapat digunakan untuk memonitor infeksi subklinis penyakit AI.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Moneim AS, Afifi MA, El-Kady MF. 2011. Genetic drift evolution under vaccination pressure among H5N1 Egyptian isolates. *Virology* 438:283.
- Antara News. 2007. Antara news. Antara News [Internet]. Available from: <http://www.antaraneews.com/>
- Avellaneda G, Mundt E, Lee CW, Jadhao S, Suarez DL. 2010a. Differentiation of infected and vaccinated animals (DIVA) using the NS1 protein of avian influenza virus. *Avian Dis*. 54:278-286.
- Avellaneda G, Sylte MJ, Lee CW, Suarez DL. 2010b. A heterologous neuraminidase subtype strategy for the differentiation of infected and vaccinated animals (DIVA) for avian influenza virus using an alternative neuraminidase inhibition test. *Avian Dis*. 54:272-277.
- Basuno E. 2008. *Review dampak wabah dan kebijakan pengendalian Avian Influenza di Indonesia. Analisis Kebijakan Pertanian*. 6:314-334.
- Bett B, McLaws M, Jost C, Schoonman L, Unger F, Poole J, Lapar ML, Siregar ES, Azhar M, Hidayat MM, et al. 2013. The effectiveness of preventative mass vaccination regimes against the incidence of highly pathogenic avian influenza on Java Island, Indonesia. In: *Transbound Emerg Dis*.
- Bouma A, Muljono AT, Jatikusumah A, Nell AJ, Mudjiartiningih S, Dharmayanti I, Siregar ES,

- Claassen I, Koch G, Stegeman JA. 2008. Field trial for assessment of avian influenza vaccination effectiveness in Indonesia. *Rev Sci Tech*. 27:633-642.
- Bublot M, Manvell RJ, Shell W, Brown IH. 2010. High level of protection induced by two fowlpox vector vaccines against a highly pathogenic avian influenza H5N1 challenge in specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis*. 54:257-261.
- Bublot M, Pritchard N, Cruz JS, Mickle TR, Selleck P, Swayne DE. 2007. Efficacy of a fowlpox-vectored avian influenza H5 vaccine against Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza virus challenge. *Avian Dis*. 51:498-500.
- Bublot M, Pritchard N, Swayne DE, Selleck P, Karaca K, Suarez DL, Audonnet JC, Mickle TR. 2006. Development and use of fowlpox vectored vaccines for avian influenza. *Ann NY Acad Sci*. 1081:193-201.
- Capua I, Cattoli G, Marangon S. 2004. DIVA-a vaccination strategy enabling the detection of field exposure to avian influenza. *Dev Biol (Basel)*. 119:229-233.
- Capua I, Terregino C, Cattoli G, Mutinelli F, Rodriguez JF. 2003. Development of a DIVA (Differentiating infected from vaccinated animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol*. 32:47-55.
- Cattoli G, Milani A, Bettini F, Beato MS, Mancin M, Terregino C, Capua I. 2006. Development and validation of an anti-N3 indirect immunofluorescent antibody test to be used as a companion diagnostic test in the framework of a "DIVA" vaccination strategy for avian influenza infections in poultry. *Avian Pathol*. 35:154-159.
- Cauthen AN, Swayne DE, Sekellick MJ, Marcus PI, Suarez DL. 2007. Amelioration of influenza virus pathogenesis in chickens attributed to the enhanced interferon-inducing capacity of a virus with a truncated NS1 gene. *J Virol*. 81:1838-1847.
- Conan A, Goutard FL, Sorn S, Vong S. 2012. Biosecurity measures for backyard poultry in developing countries: A systematic review. *BMC Vet Res*. 8:240.
- Damayanti R, Dharmayanti NLPI, Wiyono A, Indriani R, Darminto. 2004. Gambaran klinis dan patologi pada ayam yang terserang flu burung sangat patogenik (HPAI) di beberapa peternakan di Jawa Timur dan Jawa Barat. *JITV*. 9:128-135.
- Dharmayanti NLPI, Damayanti R, Wiyono A, Indriani R, Darminto. 2004. Identification of avian influenza virus of Indonesian isolates by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) method. *JITV*. 9:136-143.
- Dundon WG, Capua I. 2009. A closer look at the NS1 of influenza virus. *Viruses*. 1:1057-1072.
- FAO. 2011. Approaches to controlling, preventing and eliminating H5N1 highly pathogenic avian influenza in endemic countries. Rome (Italy): FAO.
- Gerdil C. 2003. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine*. 21:1776-1779.
- Grund C, Abdelwhab ESM, Arafa AS, Ziller M, Hassan MK, Aly MM, Hafez HM, Harder TC, Beer M. 2011. Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 from Egypt escapes vaccine-induced immunity but confers clinical protection against a heterologous clade 2.2.1 Egyptian isolate. *Vaccine*. 29:5567-5573.
- Hadifar F, Ignjatovic J, Tarigan S, Indriani R, Ebrahimie E, Hasan NH, McWhorter A, Putland S, Ownagh A, Hemmatzadeh F. 2014. Multimeric recombinant M2e protein-based ELISA: A significant improvement in differentiating avian influenza infected chickens from vaccinated one. *PLoS One*. 9:e108420.
- Hemmatzadeh F, Sumarningsih S, Tarigan S, Indriani R, Dharmayanti NLPI, Ebrahimie E, Ignjatovic J. 2013. Recombinant M2e Protein-Based ELISA: A novel and inexpensive approach for differentiating avian influenza infected chickens from vaccinated ones. *PLoS One*. 8:e56801.
- Hinrichs J, Otte J, Rushton J. 2009. Epidemiological and Financial Implications of HPAI vaccination. Mekong Team Working Paper No. 11. London (UK): A Collaborative Research Project Funded by DFID Implemented by Department for International Development (DFID).
- Indriani R, Dharmayanti NLPI, Adjid RMA. 2011. Tingkat proteksi beberapa vaksin *Avian Influenza* unggas terhadap infeksi virus isolat lapang A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008. *JITV*. 16:153-161.
- IVM Online. 2014. The effort to fight influenza virus in Indonesia. *Influ Virus Monit [Internet]*. [cited 18 January 2015]. Available from: http://www.fao.org/AG/AGAInfo/programmes/en/empres/documents/doc s/IVM_online_brochure.pdf
- Jadhao SJ, Lee CW, Sylte M, Suarez DL. 2009. Comparative efficacy of North American and antigenically matched reverse genetics derived H5N9 DIVA marker vaccines against highly pathogenic Asian H5N1 avian influenza viruses in chickens. *Vaccine*. 27:6247-6260.
- Johansson BE, Bucher DJ, Kilbourne ED. 1989. Purified influenza virus hemagglutinin and neuraminidase are equivalent in stimulation of antibody response but induce contrasting types of immunity to infection. *J Virol*. 63:1239-1246.
- Kim J-K, Kayali G, Walker D, Forrest HL, Ellebedy AH, Griffin YS, Rubrum A, Bahgat MM, Kutkat MA, Ali MAA, et al. 2010a. Puzzling inefficiency of H5N1 influenza vaccines in Egyptian poultry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:11044-11049.
- Kim MC, Choi JG, Kwon JS, Kang HM, Paek MR, Jeong OM, Kwon JH, Lee YJ. 2010b. Field application of the H9M2e enzyme-linked immunosorbent assay for differentiation of H9N2 avian influenza virus-infected chickens from vaccinated chickens. *Clin Vaccine Immunol*. 17:1977-1984.

- Kompas. 2008. Kerugian akibat flu burung capai Rp. 4,1 triliun. Kompas [Internet]. [disitasi 16 Maret 2015]. Tersedia dari: <http://nasional.kompas.com/read/2008/03/24/1551076/Kerugian.Akibat.Flu.Burung.Capai.Rp4.1.Triliun>
- Kwon JS, Kim MC, Jeong OM, Kang HM, Song CS, Kwon JH, Lee YJ. 2009. Novel use of a N2-specific enzyme-linked immunosorbent assay for differentiation of infected from vaccinated animals (DIVA)-based identification of avian influenza. *Vaccine*. 27:3189-3194.
- Lamb RA, Zebedee SL, Richardson CD. 1985. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell*. 40:627-633.
- Lambe T. 2012. Novel viral vectored vaccines for the prevention of influenza. *Mol Med*. 18:1153-60.
- Lambrecht B, Steensels M, Van Borm S, Meulemans G, van den Berg T. 2007. Development of an M2e-specific enzyme-linked immunosorbent assay for differentiating infected from vaccinated animals. *Avian Dis*. 51:221-226.
- Liu W, Zou P, Ding J, Lu Y, Chen Y-H. 2005. Sequence comparison between the extracellular domain of M2 protein human and avian influenza A virus provides new information for bivalent influenza vaccine design. *Microbes Infect*. 7:171-177.
- Liu Y, Mundt E, Mundt A, Sylte M, Suarez DL, Swayne DE, García M. 2010. Development and evaluation of an avian influenza, neuraminidase subtype 1, indirect enzyme-linked immunosorbent assay for poultry using the differentiation of infected from vaccinated animals control strategy. *Avian Dis*. 54:613-621.
- Nurhayati. 2014. Perkembangan kasus *Avian Influenza* (AI) pada unggas kondisi s/d 31 Oktober. Direktorat Kesehatan Hewan [Internet]. [disitasi 16 Maret 2015]. Tersedia dari: <http://keswan.ditjennak.pertanian.go.id/index.php/blog/read/berita/perkembangan-kasus-ai-pada-unggas-kondisi-sd-31-oktober-2014>
- Peeters B, Boer SM de, Tjeerdsm G, Moormann R, Koch G. 2012. New DIVA vaccine for the protection of poultry against H5 highly pathogenic avian influenza viruses irrespective of the N-subtype. *Vaccine*. 30:7078-7083.
- Sekjen Kemenkes. 2015. Laporan kasus flu burung ke-198 dan 199. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia [Internet]. [disitasi 16 Maret 2015]. Tersedia dari: <http://www.depkes.go.id/article/view/15040100002/laporan-kasus-flu-burung-ke-198-dan-199.html>
- Siregar SE, Darminto, Weaver J, Bouma A. 2007. The vaccination programme in Indonesia. *Dev Biol (Basel)*. 130:151-158.
- Spackman E, Swayne DE. 2013. Vaccination of gallinaceous poultry for H5N1 highly pathogenic avian influenza: Current questions and new technology. *Virus Res*. 178:121-132.
- Suarez DL. 2005. Overview of avian influenza DIVA test strategies. *Biologicals*. 33:221-226.
- Sudarisman. 2006. Pengaruh penggunaan vaksin H5N1 dan H5N2 virus *Avian Influenza* pada peternakan unggas di daerah Jawa Barat. Dalam: Mathius IW, Sendow I, Nurhayati, Murdiati TB, Thalib A, Beriajaya, Prasetyo LH, Darmono, Wina E, penyunting. Cakrawala Baru IPTEK Menunjang Revitalisasi Peternakan. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 5-6 September 2006. Bogor (Indonesia): Puslitbangnak. hlm. 766-773.
- Swayne DE, Pavade G, Hamilton K, Vallat B, Miyagishima K. 2011. Assessment of national strategies for control of high-pathogenicity avian influenza and low-pathogenicity notifiable avian influenza in poultry, with emphasis on vaccines and vaccination. *Rev Sci Tech*. 30:839-870.
- Swayne DE. 2006. Principles for vaccine protection in chickens and domestic waterfowl against avian influenza: Emphasis on Asian H5N1 high pathogenicity avian influenza. *Ann NY Acad Sci*. 1081:174-181.
- Tisoncik JR, Billharz R, Burmakina S, Belisle SE, Proll SC, Korth MJ, Garcia-Sastre A, Katze MG. 2011. The NS1 protein of influenza A virus suppresses interferon-regulated activation of antigen-presentation and immune-proteasome pathways. *J Gen Virol*. 92:2093-2104.
- Tumpey TM, Alvarez R, Swayne DE, Suarez DL. 2005. Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus. *J Clin Microbiol*. 43:676-683.
- USAID. 2009. Operational research in Indonesia for more effective control of highly pathogenic avian influenza. Cooperative agreement No. 497-A-00-07-00021-00. Final Report. Washington DC (US): United States Agency for International Development.
- Wang L, Qin Z, Pantin-Jackwood M, Faulkner O, Suarez DL, Garcia M, Lupiani B, Reddy SM, Saif YM, Lee CW. 2011. Development of DIVA (differentiation of infected from vaccinated animals) vaccines utilizing heterologous NA and NS1 protein strategies for the control of triple reassortant H3N2 influenza in turkeys. *Vaccine*. 29:7966-7974.
- Zhao S, Jin M, Li H, Tan Y, Wang G, Zhang R, Chen H. 2005. Detection of antibodies to the nonstructural protein (NS1) of avian influenza viruses allows distinction between vaccinated and infected chickens. *Avian Dis*. 49:488-493.