

Ekskresi Virus Avian Influenza H5 setelah Uji Tantang pada Ayam yang Diimunisasi dengan Virus Avian Influenza (H5N1) Strain Indonesia dan Vaksin Heterolog Komersial

Avian Influenza H5 Virus Excretion Post Challenge Test of Chickens Immunized with Avian Influenza (H5N1) Virus Indonesian Strain and Commercial Heterologous Vaccine

¹A. P. Rahardjo, ²Ghea Anindyaputri, ¹A. T. S. Estoepangestie, ¹Imam Mustofa

¹ Fakultas Kedokteran Hewan Unair

² PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya-60115.

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email : rahardjo_adi@yahoo.com

Abstract

The aim of the study was to detect Avian Influenza H5 viral shedding in chickens post immunized using Indonesian virus isolates and commercial vaccines, after challenge using Indonesian Avian Influenza H5N1 isolates. Six groups of chickens were vaccinated , five groups using several Indonesian virus isolates Avian Influenza H5N1, while the remaining group using commercial vaccine. Four weeks after the last booster vaccination, all groups of chickens were challenged with A/Ck/Indonesia/BL/2003 (H5N1) virus isolates. At day 1 to 8 post challenge, cloacal swabs were taken followed by isolation in 8 to 10 days old embryonated eggs and confirm using HA and HI test. The result showed that *Avian Influenza* fecal viral shedding in vaccinated group was low to completely negative, while in control group could be detected from second up to fourth days post challenged until the death of chickens.

Keywords : viral shedding, Avian Influenza Indonesian virus isolates, cloacal swabs.

Pendahuluan

Virus Influenza termasuk dalam family *Orthomyxoviridae* dengan 3 macam tipe, yaitu tipe A, tipe B, dan tipe C (Chan, 2002). Virus *Avian Influenza* termasuk di dalam virus influenza tipe A (Harimoto and Kawaoka, 2001; Lebdah *et al.*, 2010). Berdasarkan atas struktur antigen permukaan, yaitu *hemagglutinin* (HA) dan *neuramidase* (NA), maka virus Influenza A dikelompokkan menjadi banyak sub tipe (Tabbu, 2000). Terdapat 16 jenis sub tipe HA (HA1-HA16) dan 9 jenis sub tipe NA (NA1-NA9) (Radji, 2006; Steitz *et al.*, 2010; Easterday *et al.*, 1997).

Pencegahan dan pengendalian penyakit *Avian Influenza* adalah resistensi unggas melalui vaksinasi pada unggas yang sehat (Heryanto, 2009). Vaksinasi dapat meningkatkan resisten dari penyakit di peternakan, mengurangi *virus shedding* (virus yang dikeluarkan melalui kotoran/feses hewan tertular), dan mencegah transmisi antar unggas (Lebdah *et al.*, 2010; Swayne *et al.*, 2000).

Tingkat keberhasilan vaksinasi berdasarkan uji titer antibodi *Hemagglutination Inhibition* (HI) adalah nilai titer minimal 16 (2^4) pasca 3

minggu vaksinasi. Respon kekebalan pada ayam dengan titer HI tinggi dapat melindungi dari serangan virus (Steitz, *et al.*, 2010).

Penelitian ini dilakukan dengan harapan ayam yang telah divaksinasi *Avian Influenza* strain lokal kemudian ditantang oleh virus *Avian Influenza* (H5N1), dapat meniadakan ekskresi virus. Upaya pengurangan jumlah ekskresi virus ini, dimaksudkan kontaminasi pada lingkungan dapat dikurangi dan membatasi penyebaran / transmisi virus dari satu unggas ke unggas lainnya.

Materi dan Metode Penelitian

Ayam yang digunakan adalah ayam layer jantan strain ISA Brown CP, dibagi dalam 6 kelompok masing-masing 3 ekor ayam. Kelompok A, B, C, D, dan E diimunisasi dengan kandidat vaksin *Avian Influenza*, F divaksin dengan vaksin komersial heterolog dan 1 kelompok sebagai kontrol negatif tidak divaksinasi.

Uji HI dilakukan dengan menggunakan *microplate* "V" (OIE, 2008). Dosis infeksi ditentukan dengan melakukan titrasi suspensi virus menggunakan larutan NaCl fisiologis (Otsu-Ns) yang mengandung Streptomycin sulfat dan peni-

cillin. Masing-masing konsentrasi suspensi virus diinokulasikan pada 6 TAB dengan dosis 0,1 ml/TAB pada kantung allantois, kemudian dieram-kan dalam inkubator .

Uji tantang dilakukan pada ayam berumur 10 minggu, diinfeksi dengan suspensi virus *Avian Influenza A/Ck/Indonesia/BL/03* (H5N1) sebanyak 0,1 ml/ekor dengan dosis 10^8 EID₅₀/ml dengan cara ditetaskan pada mulut dan hidung.

Sampel swab kloaka pada hari ke 1 sampai dengan 8 pasca uji tantang, diinokulasikan pada TAB umur 8-10 hari masing-masing 3 TAB/sampel, selanjutnya dilakukan uji HI.

Hasil dan Pembahasan

Kelompok ayam yang divaksinasi dengan kandidat vaksin A, B, C, D, E dan vaksin komersial heterolog memiliki titer antibodi yang hampir sama antara 2^5 - 2^{10} . Kelompok ayam yang divaksinasi kandidat vaksin B memiliki titer antibodi yang paling tinggi dan pada vaksin komersil memiliki titer antibodi yang paling rendah. Hal ini disebabkan karena *seed* virus yang terkandung pada setiap vaksin antigenitas dan imunogenitasnya berbeda, sehingga respon ke-kebalan yang ditimbulkan oleh vaksin juga berbeda (tabel 1).

Hasil swab kloaka ayam setiap hari selama 8 hari pasca uji tantang, kelompok ayam yang divaksinasi dengan kandidat vaksin A, B, C, D, E dan vaksin komersil (F) meng-ekskresikan virus antara 1 sampai dengan 3 hari. Bahkan pada kelompok ayam yang divaksin dengan kandidat vaksin E tidak terdeteksi adanya *fecal virus shedding*.

Kelompok ayam A, B, dan F meng-ekskresikan virus hanya sehari, sedangkan kelompok ayam C meng-ekskresikan virus se-lama 3 hari (tabel 2). Hal tersebut disebabkan respon ke-kebalan yang ditimbulkan setiap vaksin berbeda, namun dengan vaksinasi dapat mengurangi *fecal virus shedding* atau bahkan negatif. Hal ini dapat diamati dari patogenesis penyakit dalam tubuh ayam yang diinfeksi virus *Avian Influenza*. Pembentukan antibodi berdasarkan waktu pema-parannya dapat dibedakan menjadi dua tahap, respon imun primer dan respon imun sekunder (Goldsby *et al.*, 2000; Abbas, 2003).

Tabel 1 Titer antibodi ayam pada setiap kelompok perlakuan

Kelompok Perlakuan	Kelompok ayam	Titer Ab pasca imunisasi
A	Ayam 1	2^7
	Ayam 2	2^7
	Ayam 3	2^6
B	Ayam 1	2^7
	Ayam 2	2^{10}
	Ayam 3	2^8
C	Ayam 1	2^6
	Ayam 2	2^7
	Ayam 3	2^7
D	Ayam 1	2^8
	Ayam 2	2^6
	Ayam 3	2^8
E	Ayam 1	2^7
	Ayam 2	2^6
	Ayam 3	2^8
F	Ayam 1	2^5
	Ayam 2	2^7
	Ayam 3	2^6
G	Ayam 1	2^0
	Ayam 2	2^0
	Ayam 3	2^0

Keterangan:

- A, B, C, D, dan E : kelompok ayam di-imunisasi kandidat vaksin *Avian Influenza*
- F : kelompok ayam divaksin dengan vaksin heterolog komersial *Avian Influenza*
- G : kelompok ayam kontrol tanpa divaksinasi

Virus masuk kedalam tubuh ayam yang telah memiliki respon kekebalan dalam bentuk antibodi, maka jalan masuknya virus (*port of entry*) pada mukosa saluran pernafasan dan saluran pencernaan akan diselubungi oleh antibodi (Ig A). Proses selanjutnya respon imun yang dihasilkan oleh vaksinasi adalah respon imun humoral (antibodi) dan respon imun seluler (Abbas, 2003). Virus yang dapat menembus mukosa dan masuk aliran darah, maka virus akan dinetralisasi oleh antibodi dalam aliran darah yang telah dibentuk oleh respon kekebalan humoral. Hal ini yang menyebabkan ada vaksin yang sama sekali tidak mengeluarkan virus *shedding* pada feses pasca

Tabel 2 *Fecal virus shedding* pada hari 1-8 pasca uji tantang

KODE	Hari 1	Hari 2	Hari 3	Hari 4	Hari 5	Hari 6	Hari 7	Hari 8
A	AYAM 1	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	AYAM 2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	AYAM 3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
B	AYAM 1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	AYAM 2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	AYAM 3	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
C	AYAM 1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
	AYAM 2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	AYAM 3	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
D	AYAM 1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	AYAM 2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
	AYAM 3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
E	AYAM 1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	AYAM 2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	AYAM 3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
F	AYAM 1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	AYAM 2	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	AYAM 3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
G	AYAM 1	(-)	(+)	(+)	†	†	†	†
	AYAM 2	(-)	(-)	(+)	(+)	†	†	†
	AYAM 3	(-)	(+)	(+)	(+)	†	†	†

Tabel 3 Hasil pengamatan akumulatif ayam yang divaksinasi dengan kandidat vaksin A, B, C, D, E dan vaksin komersil F

Kelompok	Umur ayam saat uji tantang (4 minggu pasca vaksinasi)	Σ Ayam yang mengekskresikan virus AI pada hari pasca uji tantang								Σ <i>Fecal Virus shedding</i> pada kelompok ayam
		1	2	3	4	5	6	7	8	
A	10 minggu	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/24
B	10 minggu	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/24
C	10 minggu	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	1/3	0/3	3/24
D	10 minggu	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	0/3	2/24
E	10 minggu	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/24
F	10 minggu	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/24
G	10 minggu	0/3	2/3	3/3	2/2	†	†	†	†	-

Keterangan: G sebagai kelompok kontrol

infeksi. Namun ada juga vaksin yang mengeluarkan virus *shedding* hanya sedikit, sehari atau dua hari saja. Kemungkinan virus telah menginfeksi usus tetapi terjadi proses penyembuhan, sehingga virus tidak dikeluarkan kembali.

Penyebaran virus dalam tubuh dapat melalui aliran darah (viremia) dan dapat men-

jangkau organ-organ penting dalam tubuh unggas. Bila virus telah menginfeksi usus, akan mengakibatkan virus dapat diekskresikan melalui feses. Apabila virus telah menginfeksi organ-organ penting, mengakibatkan kegagalan fungsi dari organ dan diikuti dengan kematian. Dari proses infeksi diatas dapat menjadi dasar mengapa ayam kontrol

telah mengeluarkan virus *shedding* pada hari ke-2 pasca infeksi dan hari ke-5 pasca infeksi ayam telah mati seluruhnya.

Penelitian ini dilakukan dengan dasar penelitian sebelumnya, penelitian yang dilakukan Balai Penelitian Veteriner Bogor melaporkan pada studi kasusnya memperlihatkan bahwa ayam mengekskresikan virus sampai hari ke-5 pasca uji tantang, namun hari ke-7 sampai dengan hari ke-14 tidak lagi mengekskresikan virus pada fesesnya. Vaksin isolat lokal yang digunakan disamping memberikan proteksi juga mampu mengurangi lama ekskresi virus tantang (Indriani *et al.*, 2005).

Vaksinasi dengan vaksin inaktif *Avian Influenza* H5N1 pada tahun 2002 pernah dilakukan di Hong Kong pada peternakan unggas yang terjangkit *Avian Influenza* H5N1. Delapan belas hari pasca vaksinasi tingkat kematian ayam akibat *Avian Influenza* menurun, dan setelah dilakukan monitoring dengan isolasi virus ternyata ayam-ayam di peternakan tersebut tidak ada lagi *fecal virus shedding* (Ellis *et al.*, 2004).

Kesimpulan

Ayam yang telah divaksinasi dengan kandidat vaksin A, B, C, D, E strain Indonesia dapat memberikan titer antibodi yang tinggi terhadap virus *Avian Influenza* dan mengurangi *fecal virus shedding* yang dikeluarkan bersama feses, sama dengan hasil kelompok ayam yang divaksin komersil. Kelompok ayam yang divaksinasi dengan kandidat vaksin E tidak ditemukan adanya virus *shedding* selama 8 hari pengamatan maka dapat disimpulkan bahwa kandidat vaksin E sangat efektif dan aman digunakan untuk vaksin *Avian Influenza* pada unggas karena tidak terdeteksi *fecal virus shedding* pasca uji tantang.

Daftar Pustaka

Abbas, A. K. 2003. The control of T Cell Activation and Tolerance. *Autoimmun Rev* 2 (3): 115

Chan, P. K. 2002. Outbreak of Avian Influenza A (H5N1) Virus Infection in Hongkong in 1997. *Clin Infect Dis*, 34 (suppl 2): S 58-64.

Easterday, B.C., V.S. Hinshaw and D.A. Halvorson. 1997. Avian Influenza in Disease of Poultry Calnek, B. W.; Barnes, H. J.; Beard, C. W.; McDougald, L. R., and Saif, Y. M. (eds.). *Dis. of Poultry*, 10 ed. Iowa State University Press: Ames . 583-605.

Ellis, T. M., Y. H. C. Connie, K. W. Leung, K. W. Mary, Chow, Lucy, A., Bissett, W.,

Willian, Y., Guan and J. S. Malih. 2004. Vaccination of Chicken Againsts H5N1 Avian Influenza in The Face of an Out Break Interrupts Virus Transmission. *Avian Pathol*: 33: 405-412.

Goldsby, R. A., T. J. Kindt, and B. A. Osborne. 2000. *Imunologi*. 4 th ed New York: W. H. Freeman and Company. Chapter 2 and 10.

Harimoto, T., and Y. Kawaoka. 2001. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *Clin. Microbial. Rev*:14: 129-149.

Heryanto, A., Apriati, Dwiwin., I.Yhuni dan E. Bambang. 2009. Uji lapangan Vaksin Avian Influenza Produksi Pusat Veterinaria Farma. *Buletin Veterinaria Farma*, 6 (1).

Indriani, R., N. L. P. I. Dharmayanti, T. Syafriati, A. Wiyono and R. M. A. Adjid. 2005. Development Inactivated Vaccine Prototype of Avian Influenza (AI) H5N1 Local Isolate and its Application Level. *JITV* 10(4): 315-321.

Lebdah, M.A., and Shahin, A. M. 2010. Evaluation of Avian Influenza Vaccines Used in Broiler Flocks in Egypt. *Avian and Rabbit Medicine Departement, Faculty of Vet. Med.: Zagazig University*.6 (12).

Office International des Epizooties (OIE). 2008. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. OIE Terrestrial Manual. Chapter 2. 3. 4. Avian Influenza. 470-471.

Radji, M. 2006. Avian Influenza A (H5N1): Patogenesis, Pencegahan, dan Penyebaran Pada Manusia. Vol. 3.

Steitz, J., Robert.A. W., Tyler, B., Wentao, G., Ruben, O.D., and Andrea, G. 2010. Assessment of Route of Administration and Dose Escalation for an Adenovirus-Based Influenza A Virus (H5N1) Vaccine in Chickens. *Clinical and Vaccines Immunology*. 17(9): 1467-1472.

L.P. Michael, R.B. Joan, G. Maricarmen, and L.S. David. 2000. Vaccines Protect Chicken Against H5 Highly Pathogenic Avian Influenza in The Face of Genetic Change in Field Viruses Over Multiple Years. *Veterinary Microbiology*. 74: 165-172.

Tabbu, R.C. 2000. Penyakit Ayam dan Penanggulangan Penyakit Bakterial, Mikal dan Viral. Kanisius. Yogyakarta. 283-343.