

LAPORAN PENELITIAN
PROGRAM INSENTIF RISET PENINGKATAN KAPASITAS
IPTEK SISTEM PRODUKSI
TAHUN KEDUA (TAHUN ANGGARAN 2011)



**PENINGKATAN MUTU PRODUKSI *POLYVALENT LIVE VACCINE* MELALUI
SELEKSI STRAIN DAN *PRECOCIOUS LINES Eimeria* sp UNTUK
PENGENDALIAN KOKSIDIOSIS AYAM SECARA *COMPREHENSIVE***

Muchammad Yunus, Drh., M.Kes., Ph.D

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Kampus C Unair Jl. Mulyorejo Surabaya 60115

Telp. (031) 5995246, 5995247, 5995248 Fax. (031) 5962066

E-mail: infolemlit@unair.ac.id – <http://lppm.unair.ac.id>

5 NOVEMBER 2011

RINGKASAN

Pengendalian penyakit infeksius pada manusia / hewan sebagian besar bertumpu pada penggunaan antibiotik dan bahan kimia lain. WHO saat ini merekomendasikan pembatasan penggunaan antimikroba dalam pakan untuk produksi, pengembangan ternak dan penggunaan dalam mengendalikan penyakit. Beberapa negara telah menerapkan pembatasan tersebut. Akibat dari pembatasan ini bagi industri perunggasan di Indonesia adalah penurunan produktifitas akibat peningkatan kasus infeksi.

Pembatasan ini perlu diantisipasi tanpa mengganti dengan antibiotik lain untuk tujuan pencegahan dan pengobatan infeksi mikroorganisme. Untuk mengatasi kondisi tersebut penggunaan vaksin dalam pengendalian penyakit infeksius memberikan harapan dalam menghindari ketergantungan terhadap pemakaian antibiotik dan bahan kimia lain disamping itu penggunaan vaksin lebih alami, aman, efektif dan efisien dalam meningkatkan resistensi dan menghambat perkembangan agen infeksi. Salah satu bahan vaksin yang masih dan sedang dieksplorasi serta mempunyai prospek baik adalah vaksin hidup dari stadium ookista (*Live Vaccine: LV*) yang dapat dikembangkan, diproduksi massal serta dapat diaplikasikan. Pengembangan *LV* menggunakan *low-virulence precocious lines Eimeria* dapat dijadikan alternatif untuk lebih efisien, efektif dalam proteksi dan biaya dibandingkan vaksin koksidiosis ayam jenis lain seperti *killed* atau sub unit vaksin.

Pengembangan dan penggunaan *LV* untuk koksidiosis ayam selama ini belum berhasil dengan baik dikarenakan pengembangan vaksin tersebut biasanya terbatas pada salah satu atau beberapa isolat (spesies) *Eimeria* saja (*Livacox* dan *CoxAbic*, masing-masing hanya berisi isolat *E. tenella* dan *E. maxima*, Williams, 2002; Wallach, 1997). Kenyataan menunjukkan banyak kasus koksidiosis yang terjadi di beberapa farm ayam adalah infeksi campuran beberapa spesies *Eimeria*, sementara di farm yang lain oleh spesies *Eimeria* yang lain, padahal ada delapan spesies *Eimeria* penyebab koksidiosis ayam (Soulsby, 1986). Oleh karena itu program pencegahan atau proteksi terhadap koksidiosis ayam selama ini tidak sesuai harapan artinya program vaksinasi kurang berhasil dikarenakan agen atau isolat untuk proteksi terbatas pada satu atau beberapa spesies saja. Disamping itu, respon kekebalan yang terjadi akibat infeksi *Eimeria* bersifat spesies spesifik artinya vaksinasi dengan satu atau beberapa spesies *Eimeria* saja hanya dapat melindungi induk semang dari satu atau beberapa isolat tersebut. Kondisi tersebut sangat tidak menguntungkan dari segi proteksi yang dihasilkan maupun secara ekonomi apabila program vaksinasi dilakukan dengan menggunakan satu atau beberapa isolat saja dengan konsekuensi vaksinasi dilakukan beberapa kali.

Oleh sebab itu penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan dan meningkatkan mutu produksi *LV* melalui seleksi strain induk (parent strain) dan *precocious lines* delapan spesies *Eimeria* sebagai *complete polyvalent live vaccine (CPLV)* untuk proteksi secara *comprehensive* terhadap delapan spesies *Eimeria* penyebab koksidiosis ayam.

Beberapa tahapan dalam mencapai tujuan khususnya tahun pertama yang telah dilakukan adalah seleksi parent strain delapan spesies *Eimeria* sebagai strain induk dari *precocious lines Eimeria* sp. untuk pengembangan *CPLV*, atenuasi masing-masing strain dari delapan spesies *Eimeria* ayam dengan metode modifikasi periode prepaten (serial pasase) untuk pengembangan *precocious lines Eimeria* sp untuk menghasilkan *seed CPLV*. Tahun kedua beberapa tahapan yang telah diselesaikan adalah uji karakterisasi terhadap *precocious lines* delapan spesies *Eimeria* tersebut untuk sensitifitas terhadap obat, potensial reproduksi,

patogenitas dan proteksi terhadap *homologous* dan *heterologous challenges*. Tahapan ini bertujuan untuk meningkatkan mutu produksi untuk memberikan hasil yang optimal dalam aplikasi di lapangan oleh konsumen.

Hipotesis yang telah dibuktikan adalah: (1) Seleksi parent strain delapan spesies *Eimeria* sebagai strain induk dari *precocious lines Eimeria* sp. dapat dilakukan untuk pengembangan CPLV (2) Atenuasi delapan spesies *Eimeria* dengan metode modifikasi periode prepaten untuk masing-masing spesies melalui seleksi perkembangan *precocious lines Eimeria* dapat dilakukan untuk pengembangan dan produksi *seed CPLV* (3) Uji karakterisasi dapat dilakukan pada *precocious lines* delapan spesies *Eimeria* (4) Dapat dilakukan pengembangan teknik uji coba untuk mengevaluasi resistensi strain *Eimeria* terhadap koksidiostat.

Ada beberapa kriteria untuk pengembangan *polyvalent live vaccine* agar efektif dan berkualitas antara lain: strain harus sensitive terhadap obat, meskipun virulensinya rendah dan menyebabkan gejala klinis sedikit atau tidak sama sekali, strategi manajemen memerlukannya untuk pengendalian parasit. Strain virulensinya harus rendah, harus mampu merangsang respon kekebalan tanpa menimbulkan penyakit yang berat. Strain harus mempunyai potensi reproduksi yang tinggi, produksi ookista yang tinggi akan menjadikan biaya produksi menjadi lebih murah dengan demikian biaya lebih efisien dan efektif. Strain harus dapat melindungi dari infeksi baik oleh strain induk atau strain dengan tingkat virulen yang berbeda dalam spesies yang sama.

Outline dari penelitian ini: (1) Biosafety dan karantina: *rearing* ayam bebas koksidia, *housing* ayam penelitian, prosedur laboratorium, *disposal* dan *decontamination*. (2) Seleksi strain induk untuk pengembangan vaksin. (3) Seleksi untuk perkembangan *precocious lines Eimeria*. (4) Uji karakterisasi terhadap *precocious lines Eimeria*: uji sensitifitas obat, patogenitas, *homologous* dan *heterologous challenges*, potensial reproduksi masing-masing spesies *Eimeria* (produksi ookista), analisis statistik. (5) Penyimpanan parasit (Frozen, Nitrogen cair) dengan teknik dan lama penyimpanan sesuai prosedur (Shirley, 2005) (6) Evaluasi resistensi terhadap koksidiostat yang digunakan untuk program pencegahan (*Prophylactic coccidiostat*): disain uji, seleksi parasit *Eimeria* untuk evaluasi dan validitas disain uji.

Bentuk keluaran (*Deliveries*) yang ditargetkan dari penelitian ini adalah: Produk CPLV dan berkualitas untuk mengendalikan koksidiosis ayam secara *comprehensive* dalam rangka melindungi dan meningkatkan performan dan produktifitas unggas, Disain untuk prosedur uji coba resistensi koksidiostat, HAKI berupa paten, beberapa artikel ilmiah yang dipublikasikan pada jurnal nasional terakreditasi.

Efek dari diseminasi hasil riset/kegiatan bagi industri, ekonomi dan masyarakat Indonesia adalah adanya produk CPLV dapat digunakan untuk memprotek/melindungi ayam dari infeksi semua spesies *Eimeria* penyebab koksidiosis ayam dan secara ekonomis (tenaga, biaya dan waktu) lebih menguntungkan daripada LV yang hanya terdiri satu atau beberapa spesies saja. Penggunaan CPLV signifikan mengurangi penggunaan koksidiostat (menekan resistensi dan residu), efektif menurunkan kerugian dan biaya produksi akibat infeksi, khususnya mengantisipasi adanya pembatasan atau larangan penggunaan koksidiostat dimasa mendatang. Efektifitas dan efisiensi penggunaan CPLV meningkatkan *sustainability* dan *profitability* industri perunggasan Indonesia, industri perunggasan menjadi lebih efisien dan dapat bersaing ditingkat global, dapat membangun image produk dan industri yang baik. Mencegah penurunan nilai produk ekspor asal hewan ke negara tujuan

yang memberlakukan standard ketat terhadap residu dalam produk daging atau telur. Proyek penelitian ini didisain akan dapat merekomendasikan penetapan resistensi parasit *Eimeria* terhadap koksidiostat dan digunakan sebagai perangkat investigasi terhadap masalah resistensi, merekomendasikan produsen unggas membuat keputusan dalam program pengendalian koksidiosis.

SUMMARY

Over the past few decades control of infectious disease in humans and animals has largely relied on the use antibiotics and another chemical agents. The World Health Organisation has now recommended restrictions in the type of antimicrobials used in food production animals, livestock development and disease control. Based on their experiences, some countries have already implemented such restrictions. The consequence of this withdrawal for the poultry industry in Indonesia is reduction of productivity due to an increased incidence of infection by certain pathogens. This restriction of the use of antibiotic is necessary anticipated without appropriate substitutes for prophylactic and cure antibiotics to microorganisms infection. Faced with these restrictions, the use of vaccine to control infectious disease is more expectant to avoid dependence upon the use of antibiotic and other chemical agents. Moreover the use of vaccine is more natural, safe, effective and effecient to enhance resistance and to obstruct the development of infection agent. One of vaccine materials has being explorated and it has good prospected is live vaccine of oocysts that can be massly developed, producible and applicable. The development of live vaccine using low-virulence precocious lines of *Eimeria* can be used as an alternative to become more efficient and effective in potential protection and cost compared the other avian coccidiosis vaccine such as killed and/or sub unit vaccine. So far, the development and the use of live avian coccidiosis vaccine actually is not successful because that vaccine development is usually limited for the only one and/or some *Eimeria* species (Livacox and CoxAbic contain *E. tenella* and *E. maxima*, respectively, William, 2002; Wallach, 1997). In fact showed that many coccidiosis cases present in several poultry farms due to mixture infection by several *Eimeria* species and the other farm was by another species. In domestic fowl, coccidiosis may be caused by eight species in the genus *Eimeria*: *E. tenella*, *E. maxima*, *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. praecox*, *E. mivati* and *E. mitis* (Soulsby, 1986). Therefore prevention and/or protection program of avian coccidiosis so far is not in conformity with expectancy. In another comprehension, vaccination program is less successful due to limited *Eimeria* species. Besides immune response that due to *Eimeria* infection is specific species and it means vaccination by one and/or some *Eimeria* species only protects host from those one or some species. That circumstance is not very benefit, particularly protection and economical value if vaccination program is performed to use only one or some *Eimeria* species consequently vaccination is performed several times. **Therefore, the objective of this research** was to develop and to increase live vaccine product quality by selecting parent strains and precocious lines of nine *Eimeria* species as complete polyvalent live vaccine for protecting poultry comprehensive to eight avian *Eimeria* species infection. **Several progress steps have been achieved to those aims (the first year) were** the selection of parent strains of eight *Eimeria* species for precocious lines development of each *Eimeria* species to be developed incorporation in an efficacious complete polyvalent live vaccine, attenuation of each parent strain of eight avian *Eimeria* species with modification of the prepatent period by selecting for precocious development to result in seed complete polyvalent live vaccine to protect to *Eimeria* sp infection. The second year for several steps have been done such as characterization of that precocious lines of eight avian *Eimeria* species in terms of drug sensitivity, reproductive potential, pathogenicity and protection against homologous and heterologous challenges. The aim of this step was to increase product quality for optimal results of field application by consumer. **Some hypothesis were proved** (1) selection of parent strain of eight avian *Eimeria* species for precocious lines development could be

performed for developing complete polyvalent live coccidiosis vaccine (2) attenuation of each parent strain of eight avian *Eimeria* species with modification of the prepatent period by selecting *Eimeria* precocious lines development can be done for developing and to produce seed complete polyvalent live coccidiosis vaccine (3) characterisation trials could be done on precocious lines *Eimeria* (4) the development of a trial technique to evaluate coccidiostat resistance to *Eimeria* strain can be done. There are some criteria in development of polyvalent live coccidiosis vaccine to be effective and good quality among other things: strains must be drug sensitive, although the low-virulence lines cause little or no disease, management strategies may require control of the parasites; strains must have low virulence, strains must be able to induce an immune response without causing severe disease; strain must maintain a reasonably high reproductive rate, a high oocyst output will enable production costs to be minimised and thus the product will be more cost-effective; strains must protect against both parent and other virulent strains of the same species. **The outlines of this research were** (1) biosafety and quarantine included rearing of coccidia-free birds, housing of experimental birds, laboratory procedure, disposal and decontamination. (2) selection of parent strains for vaccine development (3) selection for precocious development of *Eimeria* (4) Characterisation trials of precocious lines of *Eimeria* involved drug sensitivity, pathogenicity, homologous and heterologous challenges, reproductive potential (oocyst output) of each *Eimeria* species trials, statistical analysis (5) storage of parasites (frozen in liquid nitrogen) by technique and long term storage suitable procedure (Shirley, Institute of Animal Health, Compton, Newbury, Berkshire, RG20 7NN, UK) (6) evaluation of resistance to prophylactic coccidiostats that used prevention included trial design, selection of parasites for evaluation and validity of trial design. **Target of deliveries of this research were** good quality of complete polyvalent live vaccine product to control comprehensive avian coccidiosis for protecting and to increase performance and poultry productivity. The procedure of trial design of resistance to prophylactic coccidiostats, intellectual property right in patent of complete polyvalent live vaccine product. several accredited national scientific papers. **Effects of dissemination of research result** for industry, economic and Indonesian people were the presence of complete polyvalent live vaccine product can be used to protect chicken for all avian *Eimeria* species and economically more benefit than partial live vaccine. The use of complete polyvalent live vaccine was significantly decrease the use of coccidiostats (suppress resistance and residue) and effective to decrease loss and cost production due to infection particularly anticipation the presence of restriction and/or moreover stopping the use of coccidiostats in the future. Effectiveness and efficiency of the use of complete polyvalent live vaccine to support increase sustainability and profitability of poultry industry in Indonesia. Poultry industry will enable the industry to become more efficient and globally competitive and that will assist in the development of good industry and product images. To prevent decrease export value of export product from animal to export purposed country that establish strict. standard of the presence of residue in meat and egg. This research project designed will recommend the establishment of resistance coccidiostats of parasites and it can be used as instrument to investigate resistance problem, to recommend poultry produser to take the decision of coccidiosis control program.

Key words: complete live coccidiosis vaccine, precocious lines, characterization