

Peranan *Point-of-Care Test* dalam Pengendalian *Highly Pathogenic Avian Influenza* di Indonesia

(The Role of Point-of-Care Test to Control Highly Pathogenic Avian Influenza in Indonesia)

Simson Tarigan

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
simsont@me.com

(Diterima 11 Mei 2015 – Direvisi 16 Februari 2016 – Disetujui 8 Maret 2016)

ABSTRACT

Rapid diagnosis followed by stamping out protocol has proven to be the most effective means of eradicating Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) H5N1. The standard of AI tests are PCR and virus isolation, however their results often take times to initiate rapid eradication protocol. For that reason, a point-of-care (POC) test which is a rapid test used at the location of outbreak (where mortality and morbidity of poultry occur), to help field officer for identification of AI. This paper describes several techniques for detection of HPAI H5N1 virus, POC test and principal mechanism of lateral flow immunoassay which has been generally used in POC test. At present, POC test for HPAI H5N1 rather low sensitivity and expensive, therefore, further research is needed to improve its sensitivity of the tool.

Key words: H5N1, point-of-care test, lateral flow immunoassay

ABSTRAK

Penanggulangan *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) yang paling efektif adalah mendeteksi keberadaan penyakit dengan cepat diikuti dengan tindakan pemusnahan unggas tertular atau tersangka. Hasil uji standar AI, PCR dan isolasi virus, sering memakan waktu relatif lama untuk memulai langkah pemberantasan cepat. Oleh karena itu, uji *point-of-care* (POC) yang merupakan tes cepat dapat digunakan di lokasi wabah, dimana mortalitas dan morbiditas unggas sudah terjadi untuk membantu petugas lapang mengidentifikasi AI. Makalah ini menguraikan beberapa teknik untuk mendeteksi virus HPAI H5N1, uji diagnostik POC dan prinsip kerja *lateral flow immunoassay* yang banyak dipakai untuk uji POC. Saat ini, sensitivitas uji POC HPAI H5N1 masih kurang baik dan harganya mahal. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih jauh untuk meningkatkan sensitivitas alat uji.

Kata kunci: H5N1, *point-of-care test*, *lateral flow immunoassay*

PENDAHULUAN

Pada akhir tahun 2003 masyarakat dunia dikejutkan dengan kemunculan penyakit *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) H5N1 yang menimbulkan kerugian sangat besar karena menyebabkan kematian jutaan ekor unggas dan ketakutan karena dapat menular pada manusia dengan *case fatality rate* yang tinggi (Sims et al. 2005). Dalam waktu singkat 63 negara tertular penyakit tersebut tetapi sebagian besar berhasil memberantasnya dan menjaga negara tersebut tetap bebas penyakit hingga sekarang (FAO 2013). Kunci keberhasilan tersebut terletak pada deteksi penyakit dengan cepat diikuti pemusnahan semua unggas yang tertular atau dicurigai tertular dan memonitor penularan lanjutan. Semua tindakan diatas membutuhkan keterampilan dalam mengenali penyakit dengan cepat dan akurat, serta

ditentukan oleh ketersediaan alat diagnosis yang dapat memberikan hasil dengan cepat dan akurat. Tulisan ini membahas penyebaran penyakit HPAI H5N1 akibat kegagalan diagnosis dan tindakan penanggulangan cepat dimulai dari awal munculnya di Provinsi Guangdong Tiongkok dan pada awal munculnya di Indonesia. Pembahasan didominasi oleh alat diagnosis terutama yang dapat dilakukan di tempat kejadian penyakit secara cepat.

PEMUNCULAN DAN PENYEBARAN VIRUS HPAI SUBTIPE H5N1

Virus penyebab panzootik HPAI H5N1 berasal dari Provinsi Guangdong Tiongkok. Penampakan pertama virus ini berupa wabah penyakit pada peternakan angsa di Provinsi Guangdong, Tiongkok

Selatan pada tahun 1996 dengan gejala perdarahan, gangguan saraf dan kematian sekitar 40% pada peternakan yang tertular. Virus influenza subtipe H5N1 belum pernah diisolasi di daerah tersebut sebelumnya (Wan 2012; Guan & Smith 2013). Asal mula virus tersebut tidak diketahui dengan pasti tetapi diduga dari suatu galur *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) yang diintroduksi oleh burung migrasi yang singgah di tempat tersebut dan kemudian mengalami reasortan sedemikian rupa sehingga patogen pada angsa.

Setelah bersirkulasi selama beberapa tahun pada angsa, virus menyebar ke itik. Hal ini diketahui dari hasil suatu investigasi tahun 2000 dimana virus H5N1 banyak diisolasi dari itik di Tiongkok Selatan (Guan et al. 2002; Neumann et al. 2010). Virus HPAI H5N1 Guangdong, yang direpresentasikan oleh A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1), mengalami reasortan dengan virus LPAI yang terdapat pada itik dan menghasilkan beberapa galur yang sangat patogen pada ayam (Guan & Smith 2013). Hal ini terbukti dengan munculnya wabah HPAI H5N1 dengan mortalitas tinggi pada tahun 2002 di Tiongkok Selatan (Neumann et al. 2010). Setelah itu, virus menyebar dengan cepat sehingga pada waktu yang hampir bersamaan (Desember 2003-Januari 2004) wabah terjadi di delapan negara Asia Timur dan Tenggara (Sims et al. 2005). Dalam beberapa tahun, penyakit tersebut menyebar di 63 negara yang menimbulkan 400 juta kematian ayam dengan kerugian ekonomi ditaksir sebesar US\$ 20 milyar (FAO 2012).

Sampai bulan Desember 2015, HPAI H5N1 telah menelan korban sebanyak 167 jiwa di Indonesia dari 199 total kasus yang terkonfirmasi dan 449 orang korban dari 844 kasus diseluruh dunia. Tiga tahun belakangan ini kasus penyakit di Indonesia menurun drastis, hanya 2-3 kasus per tahun yang dilaporkan ke WHO (WHO 2016). Kasus pada unggas juga mengalami penurunan yang signifikan, yakni dari 2.293 kasus yang tercatat pada tahun 2009 menjadi 123 kasus pada tahun 2015.

Seandainya penyebab wabah pada angsa di Guangdong dapat diidentifikasi dan penyakit diberantas tuntas dengan cepat maka panzootik dengan kerugian yang sangat besar tersebut bisa dihindarkan. Bahkan biaya yang dikeluarkan untuk memberantas tuntas pada awal wabah sangat kecil dan mudah dibandingkan dengan kerugian yang harus ditanggung banyak negara dan kesulitan yang dihadapi mengendalikan penyakit setelah menjadi panzootik. Penyebab tidak diberantasnya penyakit saat masih pada stadium terbatas pada angsa di Guangdong karena beberapa faktor dan salah satu diantaranya mungkin keterlambatan diagnosis. Jeda antara timbulnya wabah dan penyebab diketahui dengan pasti cukup panjang, yakni sekitar tujuh bulan, karena wabah pada angsa mulai terjadi sekitar bulan Februari 1996 dan penyebab

penyakit baru dilaporkan pada tanggal 6 Oktober 1996 di suatu pertemuan ilmiah nasional Tiongkok. Pada pertemuan tersebut penyebab penyakit dilaporkan virus influenza subtipe H5N4 tetapi setelah di-*typing* ulang dinyatakan sebagai H5N1. Jeda yang panjang tersebut cukup membuat virus beradaptasi di itik menjadi patogen pada ayam dan menyebar di wilayah yang lebih luas (Wan 2012).

Penyebaran virus HPAI H5N1 ke Indonesia diduga berasal dari Provinsi Hunan melalui introduksi tunggal di Jawa Timur yang diperkirakan terjadi beberapa saat setelah bulan November 2002. Virus menyebar dari Jawa Timur ke tempat lain di Pulau Jawa dan keluar Pulau Jawa (Wang et al. 2008; Sonnberg et al. 2013). Sama seperti kejadian di Tiongkok saat munculnya HPAI H5N1, jeda antara munculnya wabah dan teridentifikasinya penyebab penyakit sangat panjang (Forster 2009). Kejadian tersebut seharusnya tidak terlampaui sulit diantisipasi karena negara lain di Asia Timur dan Tenggara sudah lebih dahulu mengidentifikasinya dan keterlambatan tersebut menimbulkan korban manusia dan kerugian ekonomi yang sangat besar (Sims et al. 2005).

Wabah penyakit yang dicurigai HPAI H5N1 mulai diberitakan di media massa pada bulan Juli 2003 tetapi pemerintah baru mendeklarasikan secara resmi pada tanggal 25 Januari 2004 setelah penyakit menyebar secara luas di pulau Jawa, Bali, Kalimantan dan Sumatera Selatan (Forster, 2009; Wibawan, 2012). Pada awal wabah, para pakar dan praktisi kesehatan hewan di Indonesia belum sepakat mengenai penyebab penyakit, sebagian menduga HPAI H5N1 tetapi sebagian lagi meyakini *very virulent Newcastle Disease* (Forster 2009). Kesulitan penentuan penyebab penyakit pada awal terjadinya wabah kemungkinan akibat beberapa kendala dan salah satu diantaranya adalah belum diterimanya metode biologi molekuler dalam mengidentifikasi virus wabah dan belum tersedianya alat diagnosis yang praktis saat itu.

DIAGNOSIS HPAI H5N1

Definisi kasus

Gejala klinis HPAI dapat dikelirukan dengan *Newcastle Disease* (ND) dan *Infectious Bursal Disease* (IBD) *virulent* dan kedua penyakit ini juga endemik pada ayam buras di Indonesia (Alders et al. 2009). Disamping itu, gejala klinis HPAI juga bisa mengalami perubahan mengikuti tingkat patogenitas virus dan status imunologis populasi ayam. Perubahan gejala klinis ini jelas terlihat pada ayam terinfeksi H5N1 di Indonesia pada saat puncak wabah tahun 2006 dan setelahnya (Wibawan 2012). Pengamatan gejala klinis diperlukan untuk mengarahkan pemeriksaan laboratoris. Sejumlah gejala klinis yang dapat dipakai

sebagai kriteria untuk menduga atau mengarahkan kepada pemeriksaan lebih lanjut disebut sebagai *clinical case definition* atau definisi kasus. Definisi kasus untuk HPAI H5N1 yang disepakati di Indonesia pada awal program *Participatory Disease Surveillance and Response* (PDSR) adalah kematian ayam secara mendadak, empat jam atau lebih awal sejak munculnya gejala klinis. Kematian mendadak merupakan satu-satunya gejala klinis yang konsisten untuk HPAI H5N1 pada ayam yang tidak memiliki kekebalan. Jadi, definisi kasus tersebut diatas ditujukan hanya untuk unggas sektor 4 (ayam buras dan itik yang dipelihara secara ekstensif) yang tidak divaksin. Gejala klinis berupa *petechiae* atau *cytosis* pada jengger, *petechiae* di kulit dada atau paha, pembengkakan kepala, salivasi, eksudat pada hidung, gejala syaraf, anoreksia dan penurunan produksi telur digunakan untuk memperkuat definisi kasus tetapi tidak dipakai sebagai definisi kasus karena pada banyak kasus HPAI H5N1 gejala tersebut tidak muncul (Robyn et al. 2012; Wibawan 2012). Diagnosis yang dibuat petugas lapang PDSR berdasarkan definisi kasus diikuti dengan alat tes cepat (produksi Korea) menghasilkan diagnosis dengan sensitivitas yang cukup memuaskan (84%) dan spesifisitas yang mendekati sempurna ($\approx 100\%$) (Robyn et al. 2012). Definisi kasus HPAI H5N1 dapat digunakan untuk unggas baik yang divaksin ataupun tidak setelah disempurnakan menjadi: (1) Kematian mendadak pada satu ekor ayam atau lebih (sektor 4) yang tidak divaksin dalam satu kandang dengan atau tanpa gejala klinis; (2) Kematian pada ayam komersial yang tidak divaksin tanpa diketahui penyebabnya, di atas 1% dalam waktu dua hari; dan (3) Kematian, penyakit parah atau penurunan produksi pada ayam komersial yang menerapkan program vaksinasi H5N1 (OIE 2014a).

Isolasi virus

Isolasi virus dilakukan dengan cara menumbuhkan virus yang terdapat pada spesimen ulas kloaka atau orofarings atau organ pada telur ayam tertunas atau biakan sel. Isolasi virus merupakan cara konfirmasi diagnosis yang paling akurat dan karenanya dipakai sebagai *golden standard test* (Spackman et al. 2008). Kelemahan utama isolasi virus sebagai alat diagnosis adalah panjangnya waktu yang diperlukan untuk mendapatkan hasil yakni antara 1-2 minggu, mahal, membutuhkan laboratorium BSL-3 dan tenaga yang terampil (Spackman et al. 2008). Walaupun demikian, isolasi virus tidak bisa digantikan teknik lain karena hasil yang diperoleh dari isolasi bukan saja diagnosis akurat tetapi virus yang diisolasi tersebut selanjutnya dapat dianalisis lebih detail seperti untuk *pathotyping*, analisis molekular epidemiologis, dijadikan sebagai bahan pembuatan alat diagnosis atau vaksin (Spackman

et al. 2008). Protokol pelaksanaan isolasi virus beserta bahan dan peralatan yang dibutuhkan telah diuraikan secara lengkap (Terregino & Capua 2009; OIE 2014b).

Polymerase chain reaction

Polymerase chain reaction (PCR) adalah teknik yang sangat sensitif untuk mendeteksi keberadaan material genetik virus karena menggandakan secara eksponensial segmen nukleotida virus sehingga jumlahnya berlipat triliunan kali. Disamping sangat sensitif, hasil pemeriksaan juga dapat diperoleh dalam hitungan jam. Disamping itu, PCR juga dapat dimodifikasi untuk mendapatkan informasi lebih banyak. Misalnya, PCR dapat dikembangkan menjadi tes *multiplex* sehingga deteksi beberapa subtype virus influenza atau beberapa penyakit dapat dideteksi sekaigus (Phan et al. 2005; Zou et al. 2007). Masalah utama PCR adalah spesifisitas yang sering rendah karena kesulitan menghindari kontaminasi silang sampel yang diperiksa. Sumber utama kontaminasi adalah produk amplifikasi pemeriksaan sebelumnya atau *carryover contamination* (Aslanzadeh 2004). Masalah tersebut dapat dikurangi secara signifikan dengan *real time reverse transcriptase* PCR (RRT PCR) karena hasil amplifikasi secara langsung dianalisis oleh mesin *thermal cyclernya*. Disamping itu, sensitivitas dan spesifisitas RRT PCR lebih tinggi dibandingkan dengan *reverse transcriptase* PCR biasa, bahkan dilaporkan mendekati virus isolasi, yakni di atas 90% (Cattoli et al. 2004; Roa et al. 2011). Selain sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, waktu yang diperlukan untuk mendapatkan hasil juga lebih singkat (Roa et al. 2011). Oleh karena itu, RRT PCR sering dipakai sebagai standar konfirmasi dan bahkan sering dipakai sebagai *golden standard test* untuk penentuan sensitivitas dan spesifisitas *immunochromatographic rapid test* (Loth et al. 2008; Al Johani et al. 2011). Protokol standar pelaksanaan PCR, baik *reverse transcriptase* PCR maupun *real time reverse transcriptase* PCR, secara lengkap telah tersedia (Cattoli & Monne 2009; Terregino & Capua 2009; OIE 2014b). Protokol standar dengan RRT PCR sudah umum digunakan dengan mengambil sampel darah dari lapang dan dibawa ke laboratorium untuk dianalisis apakah unggas terinfeksi oleh virus HPAI H5N1.

POINT-OF-CARE TESTING

Point-of-care (POC) *test* adalah uji diagnostik yang pemakaiannya di tempat pasien, hasil pemeriksaan diperoleh dalam waktu singkat (<60 menit), hasilnya mudah diinterpretasi dan langsung dipakai untuk menentukan tindakan terhadap pasien (Pai et al. 2012). *Point-of-care test* di bidang kedokteran sudah banyak

dipakai, tetapi dibidang veteriner masih jarang. *Pen-side test* atau *flock-side test* adalah istilah yang sering digunakan pada bidang veteriner sebagai pengganti istilah POC atau *bed-side test* (Manzoor et al. 2008; Soliman et al. 2010). Manfaat utama dari *pen-side test* adalah tindakan penanggulangan dapat dilakukan dengan segera sehingga penyebaran penyakit dapat dicegah. Karena tujuannya untuk mengambil tindakan cepat maka pelaksanaan pengujian di tempat kejadian penyakit sangat penting. Bila pengujian harus dilakukan di laboratorium, sekalipun dengan tes cepat, hasil pemeriksaan biasanya agak lama sampai kepada pelaksana pengambil tindakan penanggulangan penyakit. Dengan demikian, pengujian yang dilakukan di laboratorium, sekalipun dilakukan dengan alat diagnosis cepat tidak dapat dikategorikan sebagai POC *testing* (Pai et al. 2012).

Pentingnya uji POC untuk penanggulangan penyakit pada manusia sangat besar. Sebagai contoh, penggunaan sebuah uji POC sederhana di Afrika untuk menentukan diagnosis seorang anak terinfeksi bakteri dapat menyelamatkan sekitar 150.000 anak dari kematian setiap tahun (Lim et al. 2006). Menyadari pentingnya uji POC, berbagai negara dan yayasan seperti *Bill & Melinda Gates Foundation, US National Institutes of Health, Wellcome Trust, UK Department of International Development dan European Commission* telah menyediakan dana yang sangat besar untuk pengembangan uji POC yang dapat dipakai untuk penanggulangan penyakit menular di negara-negara berkembang (Peeling & Mabey 2010).

Kriteria uji POC yang ideal sesuai rekomendasi WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (WHO/TDR) tahun 2003 adalah sebagai berikut: (1) *Affordable*, harganya terjangkau; (2) *Sensitif*; (3) *Spesifik*; (4) *User friendly*, penggunaannya mudah yakni hanya beberapa tahapan saja dan dapat digunakan oleh personel tanpa atau setelah menjalani pelatihan singkat; (5) *Rapid and robust, reagen* untuk tes dapat disimpan dalam suhu ruangan dan hasil pemeriksaan dapat diperoleh dalam waktu kurang dari 30 menit; (6) *Equipment-free*, alat tes mudah dibawa dan pemakaiannya tidak membutuhkan fasilitas yang biasanya tidak tersedia di lapang seperti aliran listrik, air dan ruangan khusus; dan (7) *Deliverable to the users*, dapat disalurkan kepada pemakai dengan mudah (Kettler et al. 2004). Kriteria di atas, yang disingkat ASSURED (*Affordable, Sensitive, Specific, User friendly, Robust, Rapid, Equipment-free, Deliverable*) adalah kriteria yang ideal tetapi dalam kenyataannya jarang sekali ada uji POC yang dapat memenuhi kriteria tersebut dengan lengkap (Peeling & Mabey 2010).

Uji POC untuk penyakit influenza

Penyakit influenza adalah salah satu penyakit menular yang memiliki uji POC paling banyak. Di Amerika Serikat saja terdapat belasan produk uji POC komersial yang sudah mendapat lisensi dari *Food and Drug Administration (FDA)* (CDC 2012; 2015). Minimal terdapat dua penyebab mengapa uji POC begitu banyak untuk influenza. Pertama, penyakit influenza pada manusia prevalensinya tinggi. Secara global, sebanyak 500.000-1.000.000 orang meninggal akibat influenza setiap tahun (Layne et al. 2001). Kedua, penyakit influenza, tidak seperti kebanyakan penyakit viral lain, dapat diobati. Jika pengobatan dilakukan 36-48 jam setelah munculnya gejala klinis, hasilnya sangat memuaskan. Oleh karena itu, ketersediaan uji POC sangat penting (Gavin & Thomson 2003).

Performans uji POC untuk influenza pada manusia beragam tetapi umumnya mempunyai spesifisitas tinggi dengan sensitivitas relatif rendah (Tabel 1). Implikasi dari spesifitas tinggi tersebut adalah kemungkinan kekeliruan diagnosis sangat rendah apabila hasil uji positif. Sedangkan implikasi dari sensitivitas yang rendah adalah tidak dapat mengesampingkan kemungkinan pasien tidak terkena influenza bila hasil uji negatif. Walaupun performans dari uji POC beragam, target deteksi dari hampir semua uji POC adalah sama, yakni *nucleoprotein*, protein struktural virus influenza yang relatif *conserved* (de Boer et al. 1990; Gavin & Thomson 2003). Variasi dari sensitivitas analitis uji POC tersebut kemungkinan akibat dari keragaman afinitas atau aviditas antibodi terhadap *nucleoprotein* yang digunakan (CDC 2012).

Sensitifitas diagnostik dari uji POC selain ditentukan oleh sensitifitas analitik juga ditentukan oleh kandungan antigen virus dalam sampel dan kandungan antigen dalam sampel ditentukan oleh stadium penyakit, jenis spesimen dan umur penderita (Gavin & Thomson 2003). Kandungan antigen tertinggi terdapat pada sampel yang diambil antara 24-72 jam setelah munculnya gejala klinis dan pada jenis sampel berupa aspirat nosofarings atau sputum dan terendah pada sampel ulas tenggorokan (CDC 2012). Kandungan antigen pada spesimen dari anak-anak lebih tinggi dibandingkan dari yang dewasa (Gavin & Thomson 2003).

Uji POC influenza untuk unggas dan hewan jumlahnya jauh lebih sedikit dibandingkan dengan yang diperuntukkan untuk manusia, namun dibandingkan dengan penyakit hewan lain, AI merupakan salah satu penyakit hewan yang memiliki uji POC paling banyak. Sensitivitas dan spesifisitas

Tabel 1. Uji POC influenza pada manusia

Nama tes	Jumlah dan jenis spesimen	Sensitivitas	Spesifitas	Sumber
<i>Directigen EZ (Becton Dickinson)</i>	81, <i>nasal wash</i>	75%	100%	Atmar et al. (1996)
<i>Directigen EZ (Becton Dickinson)</i>	100, <i>respiratory sputum</i>	96%	100%	Barger et al. (2005)
<i>Directigen EZ (Becton Dickinson)</i>	175, ulas nasofaring	73,3%	100%	Leonardi et al. (2013)
<i>Flu-OIA (BioStar Inc.)</i>	100, <i>respiratory sputum</i>	48-100%	93-97%	Barger et al. (2005)
<i>Flu-OIA (BioStar Inc.)</i>	145, <i>respiratory sputum</i>	52-56%	97%	Hindiyeh et al. (2000)
<i>Flu-OIA (BioStar Inc.)</i>	404, ulas alat pernafasan atas	80%	73%	Covalciuc et al. (1999)
<i>Flu-OIA (BioStar Inc.)</i>	146, ulas faring	54%	74%	Boivin et al. (2001)
<i>Quidel quick vue</i>	122, ulas hidung	78-85%	97-98%	Agoritsas et al. (2006)
<i>Quidel quick vue</i>	175, ulas nasofaring	73,3%	96%	Leonardi et al. (2013)
<i>Quidel quick vue</i>	1092, ulas nasofaring	77%	96%	Simmerman et al. (2007)
<i>Remel X-pect</i>	100, <i>respiratory sputum</i>	94%	100%	Barger et al. (2005)
<i>Wampole clear view</i>	100, <i>respiratory sputum</i>	75%	100%	Barger et al. (2005)
<i>Sofia</i>	175, ulas nasofaring	80%	100%	Leonardi et al. (2013)
<i>Binax now flu A</i>	455, <i>nasal wash</i>	65%	98%	Fader (2005)

berbagai uji POC untuk AI disajikan dalam Tabel 2. Sama seperti yang diuraikan sebelumnya pada influenza manusia, sensitivitas uji POC relatif rendah dibandingkan dengan uji yang lain seperti PCR atau isolasi virus. Nilai sensitivitas diagnostik uji POC ditentukan oleh spesies unggas, jenis spesimen dan waktu pengambilan spesimen. Sensitivitas uji POC jauh lebih tinggi pada ayam dibandingkan pada itik karena *shedding* virus pada itik jauh lebih rendah (Chua et al. 2007). Apakah jumlah virus yang terkandung lebih banyak pada ulas orofaring dibandingkan dengan kloaka atau sebaliknya masih menjadi perdebatan. Sebagian peneliti melaporkan kandungan virus lebih tinggi pada ulas kloaka (Spackman et al. 2009) tetapi sebagian yang lain melaporkan sebaliknya (Chua et al. 2007). Uji POC hanya sensitif pada sampel yang diambil sekitar 2-4 hari pascainfeksi (Spackman et al. 2009) dan biasanya tidak sensitif untuk sampel yang diambil dari unggas yang terinfeksi secara subklinis (Chua et al. 2007). Pengaruh patogenitas virus terhadap jumlah virus yang dieksresikan belum diketahui dengan pasti. Woolcock & Cardona (2005) melaporkan bahwa jumlah *shedding* virus pada unggas yang diinfeksi dengan *low pathogenic* H6N2 berada di bawah deteksi uji POC untuk semua stadium infeksi. Hal serupa belum pernah dilaporkan pada infeksi HPAI. Rendahnya sensitivitas uji POC, selain akibat yang diuraikan di atas, mungkin juga disebabkan oleh mutasi virus atau perbedaan homologi protein virus.

Dampak rendahnya sensitivitas uji POC pada unggas tidak separah pada manusia. Pada manusia, hasil pemeriksaan digunakan menentukan diagnosis dan tindakan pengobatan pada level individu,

sedangkan pada unggas diagnosis dan tindakan pada level *flock* bukan individu. Sensitivitas diagnosis untuk level *flock* dapat ditingkatkan dengan menambah jumlah unggas sakit/mati yang diperiksa (Loth et al. 2008). Jadi, uji POC tidak dapat melacak keberadaan virus AI pada unggas yang secara klinis sehat.

Peranan uji POC untuk pemberantasan HPAI di Indonesia

Pada saat pemerintah Indonesia mendeklarasikan keberadaan HPAI H5N1 awal tahun 2004, penyakit sudah tersebar luas, di Pulau Jawa, Bali, Kalimantan dan Sumatera. Karena HPAI H5N1 sudah menyebar luas, cara penanggulangannya dengan *stamping out* tidak mungkin lagi dilakukan, maka pemerintah memutuskan melakukan vaksinasi massal untuk seluruh unggas. Unggas pada sektor 1, 2 dan 3 dilakukan oleh pemilik usaha sedang unggas sektor 4 dilakukan oleh pemerintah. Kriteria untuk masing-masing sektor unggas dibuat berdasarkan kesepakatan bersama negara-negara anggota FAO (FAO 2006). Vaksinasi pada sektor 1, 2 dan 3 berjalan dengan baik dan dapat menekan kematian dan penyakit klinis (Siregar et al. 2007). Akan tetapi, vaksinasi massal pada unggas sektor 4 tidak fisibel dilakukan karena kekebalan yang diperoleh dari vaksinasi tidak memuaskan dan biaya untuk pelaksanaannya sangat tinggi (USAID Indonesia 2011). Program vaksinasi massal pada unggas sektor 4 dilaksanakan hanya selama dua tahun dan itu pun tidak pernah mencapai target (Siregar et al. 2007).

Tabel 2. Uji POC influenza pada unggas

Nama tes	Jenis unggas	Jumlah dan jenis spesimen	Sensitivitas	Spesifitas	Sumber
Anigen™	Ayam ras dan buras	164, ulas orofaring dan kloaka	76%	97%	Boland et al. (2006)
Anigen™	Ayam buras	65, ulas orofaring	70%	93%	Soliman et al. (2010)
Anigen™	Ayam buras	65, ulas kloaka	76,5%	87,5%	Soliman et al. (2010)
Anigen™	Ayam buras	65, feather	65,1%	92%	Soliman et al. (2010)
Anigen™	Ayam buras	174, ulas orofaring	69%	98%	Loth et al. (2008)
<i>Quidel quick vue</i>	Ayam buras	65, ulas orofaring	70%	93%	Soliman et al. (2010)
<i>Quidel quick vue</i>	Ayam buras	65, ulas kloaka	75%	100%	Soliman et al. (2010)
<i>Quidel quick vue</i>	Ayam buras	65, ulas kloaka	65,1%	92%	Soliman et al. (2010)
<i>Flu detect</i>	Ayam buras	174, ulas orofaring	71%	98%	Loth et al. (2008)
Biota flu	Ayam ras dan buras	164, ulas orofaring dan kloaka	70%	90%	Boland et al. (2006)
<i>Directigen</i> (EZ, BD)	kalkun	232, ulas trakea	88,9%	95,7%	Cattoli et al. (2004)
<i>Directigen</i> (EZ, BD)	Ayam ras dan buras	144, ulas orofaring dan kloaka	63%	97%	Boland et al. (2006)

Sebagai pengganti program vaksinasi massal, pemerintah Indonesia dengan bantuan FAO dan sejumlah negara-negara donor, menerapkan program PDSR sebagai program pengendalian HPAI H5N1 pada unggas sektor 4. Program ini diawali dengan program *Participatory Disease Surveillance* (PDS) dan *Participatory Disease Response* (PDR) secara terpisah tetapi kemudian digabungkan menjadi satu PDSR.

Uji POC, Anigen™ yang digunakan oleh setiap petugas PDSR untuk mengkonfirmasi kasus yang memenuhi definisi kasus, hanyalah salah satu komponen kecil dari proyek PDSR. Sebagian besar tempat kejadian wabah jauh dari laboratorium diagnostik, seperti Balai Pengujian Veteriner (BPVet), laboratorium tipe B atau C, sehingga bila konfirmasi harus dilakukan di laboratorium tersebut dibutuhkan waktu yang sangat lama sampai tindakan pengendalian dapat dilakukan. Dengan diperlengkapinya staf PDSR dengan uji POC, Anigen™, selang waktu antara laporan masyarakat sampai tindakan pengendalian penyakit dilaksanakan sangat singkat rata-rata hanya 1,5 hari (Hawkes et al. 2014).

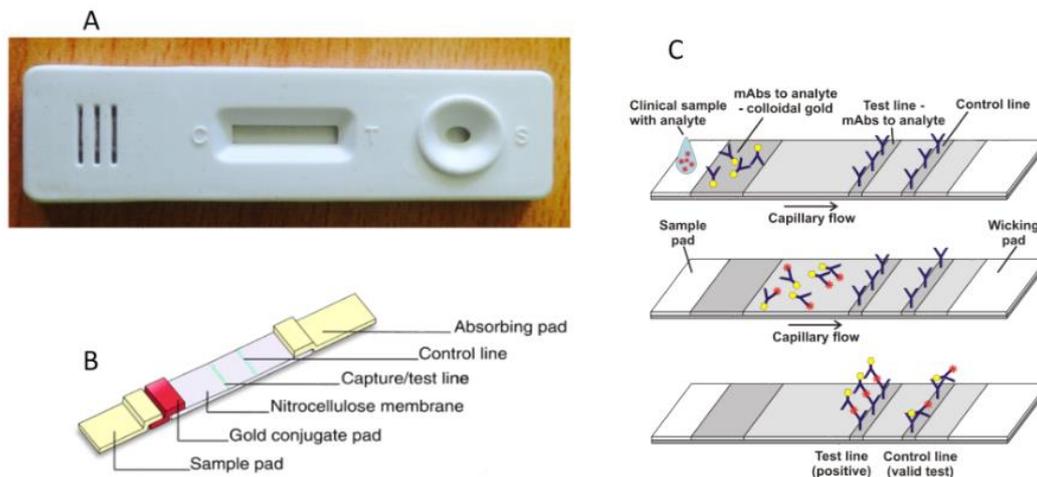
Lateral flow immunoassay

Lateral flow immunoassay (LFIA) atau *immunochromatographic assay* adalah jenis uji imunologis yang banyak dipakai untuk uji POC. *Lateral flow immunoassay* pertama kali diproduksi pada pertengahan tahun 1970an sebagai alat uji kehamilan dan hingga saat ini masih digunakan di seluruh dunia (Rivas et al. 2014). Sukses LFIA untuk uji kehamilan menginspirasi pengembangan LFIA

untuk bidang kedokteran, veteriner, makanan, pakan dan lingkungan. Pasar global LFIA pada tahun 2010 adalah sebesar US\$ 3,36 milyar dengan pertumbuhan pasar 7% per tahun maka tahun 2015 nilai pasar global untuk LFIA ditaksir sebesar US\$ 4,675 milyar (O'Farrell 2013). Nilai pasar yang begitu besar merupakan bukti bahwa LFIA merupakan jenis uji POC sesuai dengan kebutuhan konsumen. Sekalipun cocok dipakai sebagai uji POC, harga tes LFIA komersial sangat mahal. Bahkan, menurut sebuah perhitungan di Italia, biaya pemeriksaan AI dengan *Directigen™* (*Becton Dickinson*) mencapai €19,43 per sampel, lebih mahal dua kali lipat dibandingkan dengan *real time* PCR yang hanya €9,53 per sampel (Cattoli et al. 2004).

Komponen dan prinsip kerja LFIA

Komponen LFIA terdiri dari *sample pad*, *conjugate pad*, *membrane strip*, *adsorbent pad* dan *rumahan* atau *plastic cassette* (Gambar 1). *Sample pad* pada umumnya terbuat dari selulosa dan berfungsi mengkondisikan sampel dengan cara mengontrol kecepatan aliran, kekentalan dan pH sampel sedemikian rupa sehingga analit (material yang dideteksi) bereaksi secara optimum dengan antibodi konjugat dan antibodi penahan (*capture antibody*). *Conjugate pad* biasanya terbuat dari *cross-linked silica* berfungsi memberikan ruang dan kondisi yang optimum untuk analit bereaksi dengan antibodi konjugat dan melekasnya ke dalam *membrane strip* dengan efisien. *Membrane strip* yang biasanya terbuat



A: *Lateral flow immunoassay plastic cassette*; B: Isi LFIA plastic cassette¹⁾; C: Prinsip kerja LFIA²⁾

Gambar 1. *Lateral flow immunoassay*

Sumber: ¹⁾Department of Analytical Chemistry (2010); ²⁾UNSM (2015)

dari membran nitroselulosa mempunyai dua sifat penting, yakni mempunyai pori sehingga cairan yang mengandung analit dapat mengalir dari *sample pad* ke *absorption pad* dengan gaya kapiler dan dapat mengikat protein sehingga di dalamnya dapat diimobilisasi *capture antibodies*. Ada dua antibodi yang diimobilisasi dalam bentuk garis tegak lurus terhadap lintasan sampel pada membran strip yakni antibodi terhadap analit dan antibodi antispesies terhadap antibodi konjugat. *Absorption pad* biasanya terbuat dari selulosa dan berfungsi sebagai penyerap cairan dari membran strip sehingga memperbesar volume cairan yang dapat mengalir melalui membran strip.

Sampel yang akan diperiksa, seperti supernatan ulas trakea atau kloaka, ditetaskan pada lubang sampel yang di bawahnya terdapat *sample pad* (Gambar 1A dan 1B). Sampel merembes ke *conjugate pad*, yang berisi antibodi terhadap analit yang telah dikonjugasikan dengan nanopartikel seperti *gold*, *polystyrene* berwarna atau karbon. Jika sampel yang diperiksa mengandung analit maka analit akan berikatan dengan antibodi. Analit bersama konjugat merembes ke membran strip dengan gaya kapiler menuju *absorption pad* (Gambar 1C).

Berdasarkan jenis analit yang dideteksi, dikenal dua format LFIA, format *sandwich* dan *competitive*. Format *sandwich* dipakai untuk analit yang memiliki sekurang-kurangnya dua epitope, satu epitope untuk antibodi konjugat dan satu lagi untuk *capture antibody* yang diimobilisasi pada membran strip. Bila sampel mengandung analit, analit tersebut akan berikatan dengan antibodi konjugat dan kompleks analit-antibodi-konjugat ini akan tertahan (di-*captured*) oleh *captured*

antibody yang diimobilisasi pada membran strip. Oleh karena itu, reaksi positif pada format ini ditandai dengan terbentuknya garis pada *captured antibody* atau *test line* (Gambar 1C). Format *competitive* digunakan untuk analit molekul kecil yang hanya memiliki satu epitope. Berbeda dengan format *sandwich*, pada membran strip diimobilisasi senyawa yang sama dengan yang dideteksi dan antibodi antispesies. Bila sampel tidak mengandung analit yang dideteksi maka antibodi konjugat akan tertahan pada senyawa yang diimobilisasi. Dengan demikian, hasil negatif ditandai dengan terbentuknya garis pada *test line* (kebalikan dengan format *sandwich*). Bila sampel mengandung analit, analit akan berikatan dengan antibodi konjugat sehingga antibodi konjugat tidak dapat lagi berikatan dengan senyawa yang diimobilisasi, akibatnya garis tidak terbentuk pada *test line* (O'Farrell 2009).

Keunggulan uji POC terletak pada pelaksanaan tes yang mudah, dapat dilakukan di tempat kejadian penyakit dan membutuhkan waktu kurang dari 30 menit. Cepatnya pelaksanaan uji LFIA karena tidak memerlukan tahapan inkubasi dan pencucian, berbeda dengan tes imunologis pada umumnya seperti ELISA, immunoblot dan sebagainya.

Antibodi yang diperlukan untuk LFIA influenza ada tiga macam yaitu: (1) Antibodi terhadap *nucleoprotein* yang dikonjugasikan dengan *gold nanoparticle* dan akan ditempatkan pada *conjugate pad*; (2) Antibodi terhadap *nucleoprotein* tetapi mengenali epitope yang berbeda dengan antibodi pertama; dan (3) Antibodi antispesies terhadap antibodi pertama. Kualitas antibodi yang digunakan yang dinyatakan oleh afinitas dan spesifisitas antibodi

tersebut terhadap target antigen yang dideteksi. Biaya untuk antibodi tersebut sangat tergantung apakah diproduksi sendiri atau dari sumber komersial.

Produksi uji POC influenza dalam negeri

Satu satunya cara mengatasi persoalan mahal nya uji POC adalah dengan memproduksi sendiri dalam negeri. Bahan habis pakai, kecuali antibodi, harganya murah dan mesin-mesin untuk produksi massal telah tersedia secara komersial.

Kendala terbesar untuk memproduksi LFIA adalah ketidaktersediaan sumber monoklonal antibodi untuk HPAI. Sekalipun antibodi poliklonal dapat saja digunakan untuk LFIA (Jiang et al. 2011), penggunaan antibodi monoklonal memiliki berbagai keuntungan. Uji yang menggunakan antibodi monoklonal mempunyai *repeatability* dan *reproducibility* jauh lebih tinggi dibandingkan dengan yang menggunakan poliklonal. Mengingat Indonesia belum mempunyai pengalaman yang memadai dalam memproduksi antibodi monoklonal, maka pemerintah melalui lembaga riset baik di lingkungan kementerian maupun universitas dapat mendukung riset produksi monoklonal antibodi untuk pemenuhan reagen uji diagnostik terutama untuk penyakit strategis.

Kualitas monoklonal antibodi yang memenuhi syarat untuk LFIA influenza tipe A antara lain memiliki afinitas yang tinggi, berikatan dengan epitope yang merupakan domain yang *conserved* pada *nucleoprotein* atau protein M1 virus influenza dan hibridoma yang menghasilkannya stabil. Sejumlah publikasi yang mudah diakses tentang produksi antibodi monoklonal terhadap virus influenza seharusnya sangat bermanfaat untuk program produksi antibodi monoklonal dalam negeri (Bhat et al. 2013; He et al. 2013).

Aptamer sebagai alternatif antibodi monoklonal

Sejumlah penelitian membuktikan bahwa aptamer dapat dipakai sebagai pengganti antibodi monoklonal dalam *immunoassay* (Toh et al. 2015). Aptamer adalah sintetik *oligonucleotida* sepanjang 25-80 basa (RNA atau DNA) utas tunggal yang dapat berikatan dengan molekul target dengan afinitas dan spesifisitas tinggi layaknya antibodi dengan antigen. Oleh karena itu, aptamer disebut juga sintetik antibodi (Toh et al. 2015). Aptamer diproduksi secara *in vitro* dengan teknik yang disebut *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX). Secara ringkas prosedur SELEX meliputi sintesis *pool library oligonucleotida*. *Library* tersebut direaksikan dengan target molekul yang diimobilisasi pada *solid support*. Nukleotida yang terikat kepada molekul target diamplifikasi dengan PCR. Setelah proses pengikatan target dan amplifikasi

diulangi sebanyak 8-15 kali, diharapkan diperoleh *nucleotida* yang memiliki afinitas dan spesifisitas yang tinggi. Selanjutnya, *nucleotida* disekuens dan diproduksi secara sintetik menjadi aptamer (Song et al. 2008; Kedzierski et al. 2013).

Aptamer mempunyai banyak keunggulan dibandingkan dengan antibodi. Aptamer lebih stabil dibandingkan dengan antibodi yang dapat mengalami denaturasi yang ireversibel. Aptamer dapat dihasilkan untuk target yang lebih beragam bahkan untuk molekul yang kecil seperti logam, sedangkan antibodi hanya dapat dihasilkan terhadap target yang imunogenik. Berbeda dengan antibodi yang dihasilkan secara *in vivo*, aptamer dihasilkan secara sintesis sehingga lebih mudah dikontrol untuk memperoleh hasil dengan reproduksibilitas dan kemurnian yang jauh lebih tinggi (Song et al. 2008; Toh et al. 2015).

Aptamer yang dapat mengenali hemagglutinin virus influenza dari berbagai subtipe, H5N1, H1N1 dan H3N2 dengan afinitas yang tinggi telah berhasil diproduksi (Shiratori et al. 2014). Aptamer yang spesifik terhadap hemagglutinin subtipe H5 dan H7, subtipe *highly pathogenic* atau berpotensi menjadi *highly pathogenic*, juga telah diproduksi (Suenaga & Kumar 2014). Aptamer dengan spesifisitas yang sangat tinggi yakni hanya mengenali hemagglutinin dari subtipe H5N1 dan tidak ada reaksi silang bukan saja dengan hemagglutinin dari subtipe non-H5 tetapi juga dengan hemagglutinin H5 non-H5N1 (H5N2, H5N3 atau H5N9) juga telah dihasilkan (Wang et al. 2013). Aptamer yang disebutkan terakhir ini memiliki spesifisitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan monoklonal antibodi (Wang et al. 2013).

Mengingat potensinya sebagai bahan utama pengembangan alat diagnostik yang sangat besar, usaha untuk memproduksi aptamer dalam negeri seharusnya juga segera dimulai. Sampai saat ini, penelitian ke arah produksi aptamer dalam negeri belum dilakukan. Penelitian aptamer di negara lain di Asia seperti Tiongkok, Jepang, Korea dan Singapura sudah sangat maju, bahkan, berdasarkan publikasi yang dihasilkan, penelitian aptamer di Malaysia juga berkembang pesat (Omar et al. 2013; Toh et al. 2015).

Uji POC influenza di masa depan

Kelemahan utama uji POC influenza yang ada saat ini, seperti telah diuraikan di depan adalah sensitivitasnya yang relatif rendah. Rendahnya sensitivitas tersebut dalam berbagai kondisi mengharuskan konfirmasi lebih lanjut dengan alat diagnosis *standard* seperti RRT PCR atau isolasi virus. Usaha yang ditempuh untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas uji POC adalah dengan cara miniaturisasi dari uji standar. Miniaturisasi PCR sehingga dapat dipakai sebagai uji POC adalah dengan

teknik amplifikasi *isothermal* tanpa menggunakan *thermal cycler* tetapi dengan inkubator portabel kecil bertenaga baterai kecil yang disebut *loop-mediated isothermal amplification methods* (LAMP) (Imai et al. 2007; Niemz et al. 2011). Miniaturisasi PCR yang lebih canggih lagi adalah miniaturisasi menggunakan teknologi mikrofluidik. Dengan teknologi ini semua tahapan PCR, mulai dari preparasi sampel sampai analisis hasil dilakukan dalam sebuah *chip* kecil sehingga disebut juga *lab-on-a-chip* (Park et al. 2011; Su et al. 2015). Pelaksanaan PCR dalam *chip* ini memungkinkan pelaksanaan tes lebih cepat dan reagen yang digunakan jauh lebih sedikit tetapi hasilnya akurat (Park et al. 2011; Su et al. 2015). Walaupun saat ini harga *chip* tersebut masih mahal tetapi dengan berkembangnya teknologi material atau teknologi nano suatu saat di masa depan harganya diharapkan dapat terjangkau.

KESIMPULAN

Penanggulangan HPAI yang paling efektif adalah mendeteksi keberadaan penyakit dengan cepat diikuti dengan tindakan pemusnahan unggas tertular atau tersangka. Deteksi dan pemberantasan penyakit yang cepat hanya dapat terlaksana bila petugas lapangan dilengkapi dengan alat diagnosis POC. Alat diagnosis POC dipakai untuk mengkonfirmasi di tingkat lapang dugaan keterlibatan virus AI pada kejadian mortalitas dan morbiditas pada unggas sehingga tindakan penanggulangan dapat diambil dengan cepat. Alat diagnosis POC HPAI yang merupakan barang impor, harganya sangat mahal. Untuk menjamin penanggulangan HPAI H5N1 di Indonesia yang berkelanjutan maka produksi uji POC influenza dalam negeri harus diupayakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Agoritsas K, Mack K, Bonsu BK, Goodman D, Salamon D, Marcon MJ. 2006. Evaluation of the quidel quickVue test for detection of influenza A and B viruses in the pediatric emergency medicine setting by use of three specimen collection methods. *J Clin Microbiol.* 44:2638-2641.
- Al Johani SM, Al Balawi M, Al Alwan B, Al Hefdh R, Hajeer A. 2011. Validity of two rapid point of Care Influenza tests and direct fluorescence assay in comparison of real time PCR for swine of origin influenza virus. *J Infect Public Health.* 4:7-11.
- Alders RG, Bagnol B, Brum E, Lubis AS, Young MP. 2009. Continuing education in the prevention and control of HPAI: A case study on Indonesia. *Worlds Poult Sci J.* 65:529-531.
- Aslanzadeh J. 2004. Brief review: Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. *Ann Clin Lab Sci.* 34:389-396.
- Atmar RL, Baxter BD, Dominguez E a, Taber LH. 1996. Comparison of reverse transcription-PCR with tissue culture and other rapid diagnostic assays for detection of type A influenza virus. *J Clin Microbiol.* 34:2604-2606.
- Barger W, Vestal D, Engler HD, Body BA. 2005. Evaluation of lateral flow and membrane flow immunoassay for the rapid detection of influenza A and influenza B viruses. In: 21st Annual Clinical Virology Symposium. Daytona Beach, 8-11 May 2005. Florida (US): American Society for Microbiology.
- Bhat S, Bhatia S, Sood R, Bhatnagar H, Pateriya A, Venkatesh G. 2013. Production and characterization of monoclonal antibodies against nucleoprotein of avian influenza virus. *Monoclon Antibodies Immunodiagn Immunother.* 32:413-418.
- de Boer GF, Back W, Osterhaus AD. 1990. An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species. *Arch Virol.* 115:47-61.
- Boivin G, Hardy I, Kress A. 2001. Evaluation of a rapid optical immunoassay for influenza viruses (FLU OIA test) in comparison with cell culture and reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 39:730-732.
- Boland P, Weaver J, Usman TB, Andrew M, Selleck P. 2006. Field evaluation of rapid antigen tests for highly pathogenic avian influenza. In: Proc 11th International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics. Cairns (Australia): International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics.
- Cattoli G, Drago A, Maniero S, Toffan A, Bertoli E, Fassina S, Terregino C, Robbi C, Vicenzoni G, Capua I. 2004. Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. *Avian Pathol.* 33:432-437.
- Cattoli G, Monne I. 2009. Molecular diagnosis of avian influenza. In: Capua I, Alexander DJ, editors. *Avian influenza and newcastle disease. A field and laboratory manual.* Milan (Italy): Springer-Verlag. p. 87-112.
- CDC. 2012. Evaluation of 11 commercially available rapid Influenza diagnostic tests-United States, 2011-2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 16. Georgia (US): Centers for Disease Control and Prevention.
- CDC. 2015. Guidance for clinicians on the use of rapid influenza diagnostic tests. *Centres of Disease Control and Prevention* [Internet]. [cited 2015 Mar 20]. Available from: <http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/clinician-guidance>
- Chua T-H, Ellis TM, Wong CW, Guan Y, Ge SX, Peng G, Lamichhane C, Maliadis C, Tan S, Selleck P, et al.

2007. Performance evaluation of five detection tests for avian influenza antigen with various avian samples. *Avian Dis.* 51:96-105.
- Covalciuc KA, Webb KH, Carlson CA. 1999. Comparison of four clinical specimen types for detection of influenza A and B viruses by optical immunoassay (FLU OIA test) and cell culture methods. *J Clin Microbiol.* 37:3971-3974.
- Department of Analytical Chemistry. 2010. Laboratory of bioanalytical chemistry. Laboratory of Bioanalytical Chemistry [Internet]. [cited 2015 Feb 10]. Available from: <http://www.chimicabioanalitica.unito.it/>
- Fader RC. 2005. Comparison of the Binax NOW flu A enzyme immunochromatographic assay and R-mix shell vial culture for the 2003-2004 influenza season. *J Clin Microbiol.* 43:6133-6135.
- FAO. 2006. A strategic framework for HPAI prevention and control in Southeast Asia, Emergency Centre for Transboundary Animal Diseases (ECTAD). Bangkok (Thailand): FAO.
- FAO. 2012. H5N1 HPAI Global overview, January–March 2012. FAO [Internet]. [cited 2015 Apr 16]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/015/an388e/an388e.pdf>
- FAO. 2013. Lessons from HPAI-A technical stocktaking of outputs, outcomes, best practices and lessons learned from the fight against highly pathogenic avian influenza in Asia 2005-2011. Rome (Italy): FAO.
- Forster P. 2009. The political economy of avian influenza in Indonesia. Brighton (UK): STEPS Centre.
- Gavin PJ, Thomson RB. 2003. Review of rapid diagnostic tests for influenza. *Clin Appl Immunol Rev.* 4:151-172.
- Guan Y, Peiris M, Kong KF, Dyrting KC, Ellis TM, Sit T, Zhang LJ, Shortridge KF. 2002. H5N1 influenza viruses isolated from geese in Southeastern China: Evidence for genetic reassortment and interspecies transmission to ducks. *Virology.* 292:16-23.
- Guan Y, Smith GJD. 2013. The emergence and diversification of panzootic H5N1 influenza viruses. *Virus Res.* 178:35-43.
- Hawkes P, Echalar R, Budiharta S, Soenarjo S. 2014. USAID/Indonesia avian and pandemic influenza (API) program evaluation: 2009–2014. GH Tech Project Bridge IV, Report No. 14-B4-009. Jakarta (Indonesia): USAID.
- He JL, Hsieh MS, Chiu YC, Juang RH, Wang CH. 2013. Preparation of monoclonal antibodies against poor immunogenic avian influenza virus proteins. *J Immunol Methods.* 387:43-50.
- Hindiyeh M, Goulding C, Morgan H, Kenyon B, Langer J, Fox L, Dean G, Woolstenhulme D, Turnbow A, Billetdeaux E, et al. 2000. Evaluation of BioStar flu OIA assay for rapid detection of influenza A and B viruses in respiratory specimens. *J Clin Virol.* 17:119-126.
- Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, Notomi T, Ishizaki T, Van Tu P, Tien NTK, Tashiro M, Odagiri T. 2007. Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific loop-mediated isothermal amplification method. *J Virol Methods.* 141:173-180.
- Jiang T, Liang Z, Ren WW, Chen J, Zhi XY, Qi GY, Liu XT, Cai XP. 2011. A simple and rapid colloidal gold-based immunochromatographic strip test for detection of FMDV serotype A. *Virol Sin.* 26:30-39.
- Kedzierski S, Khoshnejad M, Caltagirone GT. 2013. Synthetic antibodies: The emerging field of aptamers. *Bioprocess J.* 717:46-49.
- Kettler H, White K, Hawkes S. 2004. Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections. Geneva (Switzerland): WHO/TDR.
- Layne SP, Beugelsdijk TJ, Patel CK, Taubenberger JK, Cox NJ, Gust ID, Hay AJ, Tashiro M, Lavanchy D. 2001. A global lab against influenza. *Science.* 293:17-29.
- Leonardi GP, Wilson AM, Zuretti AR. 2013. Comparison of conventional lateral-flow assays and a new fluorescent immunoassay to detect influenza viruses. *J Virol Methods.* 189:379-382.
- Lim Y-W, Steinhoff M, Girosi F, Holtzman D, Campbell H, Boer R, Black R, Mulholland K. 2006. Reducing the global burden of acute lower respiratory infections in children: The contribution of new diagnostics. *Nature.* 444:9-18.
- Loth L, Prijono WB, Wibawa H, Usman TB. 2008. Evaluation of two avian influenza type A rapid antigen tests under Indonesian field conditions. *J Vet Diagnostic Investig.* 20:642-644.
- Manzoor R, Sakoda Y, Sakabe S, Mochizuki T, Namba Y, Tsuda Y, Kida H. 2008. Development of a pen-site test kit for the rapid diagnosis of H7 highly pathogenic avian influenza. *J Vet Med Sci.* 70:557-562.
- Neumann G, Green MA, Macken CA. 2010. Evolution of highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses and the emergence of dominant variants. *J Gen Virol.* 91:1984-1995.
- Niemz A, Ferguson TM, Boyle DS. 2011. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends Biotechnol.* 29:240-250.
- O'Farrell B. 2009. Evolution in lateral flow-based immunoassay systems. In: Wong RC, Tse HY, editors. *Lateral flow immunoass.* New York (US): Springer. p. 1-34.
- O'Farrell B. 2013. Lateral flow immunoassay systems: Evolution from the current state of the art to the next generation of highly sensitive, quantitative rapid assays. In: Wild D, editor. *The immunoassay*

- handbook, theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques. 4th ed. Amsterdam (Netherlands): Elsevier. p. 89-107.
- OIE. 2014a. OIE Regional workshop on enhancing influenza A viruses national surveillance systems. In: The OIE/JTF project for controlling zoonoses in Asia under one health concept [Internet]. Tokyo, 26-28 August 2014. Paris (France): The World Organisation for Animal Health. Available from: <http://www.rr-asia.oie.int>
- OIE. 2014b. Avian influenza. In manual of diagnostic tests and vaccines for the terrestrial animals, chapter 2.3.4. The World Organisation for Animal Health [Internet]. [cited 2015 Mar 11]. Available from: <http://www.oie.int/international>
- Omar N, Loh Q, Tye GJ, Choong YS, Noordin R, Glokler J, Lim TS. 2013. Development of an antigen-DNAzyme based probe for a direct antibody-antigen assay using the intrinsic DNAzyme activity of a daunomycin aptamer. *Sensors*. 14:346-355.
- Pai NP, Vadnais C, Denkinger C, Engel N, Pai M. 2012. Point-of-care testing for infectious diseases: Diversity, complexity, and barriers in low- and middle-income countries. *PLoS Med*. 9:e1001306.
- Park S, Zhang Y, Lin S, Wang TH, Yang S. 2011. Advances in microfluidic PCR for point-of-care infectious disease diagnostics. *Biotechnol Adv*. 29:830-839.
- Peeling RW, Mabey D. 2010. Point-of-care tests for diagnosing infections in the developing world. *Clin Microbiol Infect*. 16:1062-1069.
- Phan TG, Nguyen TA, Yan H, Okitsu S, Ushijima H. 2005. A novel RT-multiplex PCR for enteroviruses, hepatitis A and E viruses and influenza A virus among infants and children with diarrhea in Vietnam. *Arch Virol*. 150:1175-1185.
- Rivas L, Escosura-Muniz ADL, Pons J, Merkoci A. 2014. Lateral flow biosensor based on gold nanoparticles. In: Valcàrcel M, López-Lorente AI, editors. *Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry Comprehensive Analytical Chemistry*. Amsterdam (Netherlands): Elsevier. p. 569-605.
- Roa PL, Catalán P, Giannella M, de Viedma DG, Sandonis V, Bouza E. 2011. Comparison of real-time RT-PCR, shell vial culture, and conventional cell culture for the detection of the pandemic influenza A (H1N1) in hospitalized patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 69:428-431.
- Robyn M, Priyono WB, Kim LM, Brum E. 2012. Diagnostic sensitivity and specificity of a participatory disease surveillance method for highly pathogenic avian influenza in household chicken flocks in Indonesia. *Avian Dis*. 56:377-380.
- Shiratori I, Akitomi J, Boltz DA, Horii K, Furuichi M, Waga I. 2014. Selection of DNA aptamers that bind to influenza A viruses with high affinity and broad subtype specificity. *Biochem Biophys Res Commun*. 443:37-41.
- Simmerman JM, Chittaganpitch M, Erdman D, Sawatwong P, Uyeki TM, Dowell SF. 2007. Field performance and new uses of rapid influenza testing in Thailand. *Int J Infect Dis*. 11:166-171.
- Sims LD, Domenech J, Benigno C, Kahn S, Kamata A, Lubroth J, Martin V, Roeder P. 2005. Origin and evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Asia. *Vet Rec*. 157:159-64.
- Siregar SE, Darminto, Weaver J, Bouma A. 2007. The vaccination programme in Indonesia. *Dev Biol*:151-158.
- Soliman M, Selim A, Coward VJ, Hassan MK, Aly MM, Banks J, Slomka MJ. 2010. Evaluation of two commercial lateral flow devices (LFDs) used for flockside testing of H5N1 highly-pathogenic avian influenza infections in backyard gallinaceous poultry in Egypt. *J Mol Genet Med*. 4:247-251.
- Song S, Wang L, Li J, Fan C, Zhao J. 2008. Aptamer-based biosensors. *TrAC-Trends Anal Chem*. 27:108-117.
- Sonnberg S, Webby RJ, Webster RG. 2013. Natural history of highly pathogenic avian influenza H5N1. *Virus Res*. 178:63-77.
- Spackman E, Pantin-Jackwood MJ, Swayne DE, Suarez DL. 2009. An evaluation of avian influenza diagnostic methods with domestic duck specimens. *Avian Dis*. 53:276-280.
- Spackman E, Suarez DL, Senne DA. 2008. Avian influenza diagnostics and surveillance methods. In: Swayne DE, editor. *Avian influenza*. Carlton (Australia): Blackwell Publishing Asia.
- Su W, Gao X, Jiang L, Qin J. 2015. Microfluidic platform towards point-of-care diagnostics in infectious diseases. *J Chromatogr A*. 1377:13-26.
- Suenaga E, Kumar PKR. 2014. An aptamer that binds efficiently to the hemagglutinins of highly pathogenic avian influenza viruses (H5N1 and H7N7) and inhibits hemagglutinin-glycan interactions. *Acta Biomater*. 10:1314-1323.
- Terregino C, Capua I. 2009. Conventional diagnosis of avian influenza. In: Capua I, Alexander DJ, editors. *Avian influenza and newcastle disease. A field and laboratory manual*. Milan (Italy): Springer-Verlag.
- Toh SY i, Citartan M, Gopinath SCB, Tang TH. 2015. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosens Bioelectron*. 64:392-403.
- UNSM. 2015. University of Nevada School of Medicine. University of Nevada School of Medicine [Internet]. [cited 2015 Feb 10]. Available from: <http://medicine.nevada.edu/>
- USAID Indonesia. 2011. Operational research in Indonesia for more effective control of highly pathogenic avian influenza. Final report. USAID project cooperative

- agreement No. 497-A-00-07-00021-00. Jakarta (Indonesia): USAID.
- Wan XF. 2012. Lessons from emergence of A/Goose/Guangdong/1996-Like H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses and recent influenza surveillance efforts in Southern China. *Zoonoses Public Health*. 59:32-42.
- Wang J, Vijaykrishna D, Duan L, Bahl J, Zhang JX, Webster RG, Peiris JS, Chen H, Smith GJ, Guan Y. 2008. Identification of the progenitors of Indonesian and Vietnamese avian influenza A (H5N1) viruses from Southern China. *J Virol*. 82:3405-3414.
- Wang RH, Zhao JJ, Jiang TS, Kwon YM, Lu HG, Jiao PR, Liao M, Li YB. 2013. Selection and characterization of DNA aptamers for use in detection of avian influenza virus H5N1. *J Virol Methods*. 189:362-369.
- WHO. 2016. *Influenza*. Geneva (Switzerland): World Health Organization.
- Wibawan IWT. 2012. *Manifestasi subklinik Avian Influenza pada unggas: Ancaman kesehatan dan penanggulangannya*. Orasi ilmiah guru besar tetap Fakultas Kedokteran Hewan. Bogor (Indonesia): Institut Pertanian Bogor.
- Woolcock PR, Cardona CJ. 2005. Commercial immunoassay kits for the detection of influenza virus type A: evaluation of their use with poultry. *Avian Dis*. 49:477-481.
- Zou S, Han J, Wen L, Liu Y, Cronin K, Lum SH, Gao L, Dong J, Zhang Y, Guo Y, Shu Y. 2007. Human influenza A virus (H5N1) detection by a novel multiplex PCR typing method. *J Clin Microbiol*. 45:1889-1892.