

## Upaya yang Penuh Tantangan Menuju Penemuan Vaksin *African Swine Fever*

### (Challenging Efforts Towards the Discovery of the African Swine Fever Vaccine)

Simson Tarigan

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE. Martadinata 30, Bogor, Indonesia  
Kontributor utama: [sitariganta@gmail.com](mailto:sitariganta@gmail.com)

(Diterima 30 Desember 2021 – Direvisi 1 April 2022 – Disetujui 16 Mei 2022)

#### ABSTRACT

African swine fever (ASF) has been endemic in Indonesia and neighbouring countries. So far, the only reliable measure to eradicate the disease has been the application of strict biosecurity and culling of all infected pigs. This method is not feasible in Indonesia because most pig farms are small with a deficient level of biosecurity. Vaccination would be the most practical control measure, but no vaccine has been available for ASF. The difficulties encountered in developing the ASF vaccine lie in the fact that the ASF virus is very complex, with a sophisticated ability to paralyze the host immune system. ASF virus infects monocytes and macrophages, causing the cells to lose their functions to mount immune responses, further complicating vaccine development. Killed vaccines, even those containing complete structural and non-structural proteins of the virus and fortified with potent adjuvants for both humoral and cellular immune responses, were practically incapable of inducing protective immunity. Subunit vaccines containing recombinant viral proteins have also been developed, but none have provided satisfactory protection even though the vaccine indicates neutralizing antibodies. Live vaccines prepared from naturally low virulent viral strains or by repeated attenuation in cell cultures provided more satisfactory protective immunities than the inactive or subunit vaccines. However, their use in the field had caused severe side effects because the mutant still had residual virulence. Live vaccines prepared by deleting genes that play a role in virulence have been the most promising approach. Several mutants that were no longer virulent but capable of inducing protective immunity have been identified; however, lengthy safety testing is still needed before this vaccine is commercially available.

**Key words:** Killed vaccine, subunit vaccine, live vaccine, gene deletion, immune evasion, African swine fever

#### ABSTRAK

Penyakit *African swine fever* (ASF) telah mewabah di Indonesia dan negara tetangga. Sampai saat ini cara penanggulangan yang dikenal efektif adalah penerapan biosekuriti ketat dan pemusnahan semua babi yang terinfeksi. Akan tetapi, cara ini tidak fisibel diterapkan di Indonesia karena sebagian besar peternakan babi merupakan peternakan kecil dengan tingkat biosekuriti yang sangat rendah. Oleh karena itu, vaksinasi merupakan cara penanggulangan yang paling praktis. Sayangnya, sampai saat ini vaksin untuk ASF belum tersedia, sekalipun usaha pengembangannya telah dimulai sejak penyakit ditemukan. Kesulitan pembuatan vaksin disebabkan karena virus ASF sangat kompleks dengan kemampuan melumpuhkan sistem imun babi yang sangat canggih. Virus ASF menginfeksi sel monosit dan makrofag, menyebabkan sel tersebut kehilangan fungsinya dalam pembentukan respons imun, dan hal ini menambah kesulitan dalam pengembangan vaksin. Vaksin in-aktif sekalipun mengandung protein virus yang utuh baik struktural maupun non-struktural, dilengkapi dengan adjuvan yang kuat tidak mampu menginduksi kekebalan yang protektif. Vaksin rekombinan sekalipun mampu menginduksi *neutralizing antibodies* yang kuat, hanya mampu mengurangi keparahan penyakit ketika babi yang telah divaksin ditantang dengan virus ASF. Vaksin aktif yang dipreparasi dari *strain virus low virulent* secara alami atau atenuasi berulang pada kultur sel memberikan kekebalan protektif yang lebih utuh, namun penggunaannya di lapangan menimbulkan efek samping yang serius karena virus mutan masih memiliki sisa virulensi. Vaksin aktif yang dipreparasi dengan mendelesi gen yang berperan dalam virulensi adalah cara yang paling besar memberikan harapan. Beberapa mutan yang stabil tidak lagi virulen tetapi mampu menginduksi kekebalan protektif telah ditemukan; namun pengujian keamanan yang panjang masih diperlukan sebelum vaksin ini dapat digunakan secara komersial.

**Kata kunci:** Vaksin inaktif, vaksin subunit, vaksin hidup, delesi gen, *immune evasion*, *African swine fever*

#### PENDAHULUAN

Wabah penyakit menular pada babi dengan morbiditas dan mortalitas yang sangat tinggi terjadi di provinsi Sumatra utara sejak bulan September 2019.

Penyakit tersebut terkonfirmasi sebagai *African swine fever* (ASF) pada 27 November 2019 dan dilaporkan ke OIE pada tanggal 17 Desember 2019 (FAO 2020). Sampai awal bulan Februari 2020 penyakit telah menyebar di seluruh provinsi Sumatera Utara dengan

kematian yang tercatat sebanyak 46.600 ekor (Okenews 11 Feb 2020). Selain di Sumatera Utara, penyakit juga dengan cepat mewabah di Kabupaten Pasaman dan Mentawai, Provinsi Sumatera Barat (Covesia News Rabu, 11 Mar 2020, Kominfo Mentawai 17 Mar 2020), Provinsi Sumatera Selatan (Jawa Pos 12 Juli 2020), Provinsi Bali (CNN Indonesia 5 Feb 2020), Provinsi Nusa Tenggara Timur (Antara 3 Juli 2020) dan Provinsi Jawa Barat (Dharmayanti et al. 2021). Kematian babi di Provinsi Nusa Tenggara Timur dalam beberapa bulan saja mencapai sekitar 22000 ekor (Antara 3 Juli 2020). Hasil analisis sekuens gene protein p72, p54 dan CD2v diketahui bahwa virus ASF yang mewabah di Sumatera Utara dan Jawa Barat termasuk genotipe II serogrup 8, satu klaster dengan virus ASF genotipe II penyebab wabah di Eropa dan Asia (Dharmayanti et al. 2021).

Penyakit ASF sudah menjadi masalah besar bagi Indonesia, terutama di daerah yang memiliki populasi babi yang tinggi. Mengingat sampai saat ini vaksin ASF belum ada, serta virus ASF sangat resisten dan dapat bertahan tahunan pada caplak babi maka penanggulangan penyakit tersebut akan sangat sulit atau bahkan tidak tertanggulangi. Walaupun penanggulangan ASF sulit, beberapa negara dapat menanggulangnya bahkan berhasil memberantasnya dengan penerapan *stamping-out policy*, yakni mengeliminasi semua ternak terjangkit atau sumber penularan penyakit. Kondisi peternakan babi di Indonesia yang sebagian besar ekstensif dengan kebiasaan memberi makan babi dengan sisa dapur rumah tangga dan restoran tidak memungkinkan menerapkan kebijakan biosekuriti ketat dan *stamping out* seperti yang pernah diterapkan di Eropa dan Amerika Selatan. Oleh karena itu, vaksinasi menjadi salah satu cara yang paling dapat diandalkan.

Usaha pengembangan vaksin telah dimulai sejak tahun 1920an sejak ASF pertama kali ditemukan, namun terlepas dari besarnya usaha yang dilakukan sampai saat ini vaksin tersebut belum juga terwujud. Tulisan ini mengulas tentang kesulitan-kesulitan yang dihadapi dan tahapan yang dicapai saat ini dalam usaha pengembangan vaksin tersebut. Tulisan ini melengkapi tulisan sebelumnya tentang penyakit *African Swine fever* yang telah diterbitkan di jurnal ini (Sendow et al. 2020).

#### INDIKASI ASF DAPAT DIKENDALIKAN DENGAN VAKSINASI

Penelitian awal ASF mengungkapkan bahwa babi yang sembuh dari ASF memiliki kekebalan terhadap reinfeksi. Akan tetapi, ketika serum dari babi yang sembuh ditransfer kepada babi sehat tidak memberikan perlindungan yang lengkap ketika ditantang dengan

virus ASF; penyakit masih tetap terjadi sekalipun masa inkubasinya pada sebagian babi lebih panjang menjadi 11-18 hari (de Kock et al. 1940). Transfer pasif spesifik antibodi memperlihatkan bahwa antibodi tidak mampu memberikan proteksi yang utuh tetapi dapat memperlambat timbulnya dan menurunkan keparahan gejala klinis, mengurangi level viremia dan menurunkan mortalitas (Schlafer et al. 1984). Peran antibodi harus dilengkapi oleh *cell mediated immunity* untuk membentuk kekebalan yang utuh. Salah satu sel yang jelas berperan adalah *natural killer (NK) cells*. Sel NK yang berasal dari babi yang diimunisasi dengan virus ASF tidak virulen memproduksi interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) dan IFN $\alpha$ , ketika babi tersebut terpapar dengan virus ASF *interferon* mampu menghambat replikasi virus dalam makrofag (Martins & Leita 1994). Fakta diatas menunjukkan bahwa vaksin yang dapat menginduksi antibodi dan *cell mediated immunity* yang tepat dapat memberikan kekebalan protektif terhadap infeksi ASF. Berbagai usaha telah dilakukan untuk menemukan vaksin yang dapat menginduksi respons imun yang protektif tersebut.

#### VAKSIN IN-AKTIF

Vaksin in-aktif adalah salah satu bentuk vaksin yang sederhana dalam pembuatannya namun sangat efektif untuk banyak penyakit viral. Hal yang sama tidak terjadi pada ASF karena babi yang diimunisasi dengan virus yang diinaktivasi tidak dapat bertahan dari kematian ketika ditantang dengan virus ASF (Stone & Hess 1967). Vaksin in-aktif yang dibuat dari sel alveolar makrofag diambil dari babi yang terinfeksi dengan virus ASF lalu diinaktivasi dengan glutaraldehid mampu menginduksi bukan saja respons humoral tetapi juga respons selular ketika diinokulasikan pada babi. Immunogen pada vaksin tersebut jauh lebih lengkap karena mengandung bukan saja struktur protein tetapi juga nonstruktur protein virus ASF. Akan tetapi, ketika babi yang telah divaksin ditantang dengan virus ASF virulen homolog, babi tidak dapat bertahan dari kematian sekalipun vaksin ini menginduksi respons selular dan antibodi yang lebih lengkap (Forman et al. 1982).

Vaksin inaktif yang menggunakan adjuvan kopolimer modern seperti Polygen<sup>TM</sup> (MVP Technologies, Omaha, USA) atau adjuvan modern emulsi minyak dalam air, Emulsigen<sup>®</sup> (MVP Technologies, Omaha, USA) yang dikombinasikan dengan *dimethyldioctadecyl ammonium bromide* (DDA) untuk menginduksi respons sel T juga telah dicoba namun tetap saja tidak memberikan perlindungan pada babi terhadap virus ASF (Blome et al. 2014).

## **WAKSIN SUBUNIT PROTEIN**

Waksin subunit berbasis protein adalah vaksin dengan rekombinan protein sebagai komponen utamanya. Protein p30, p54, p72, pp62, dan CD2v yang masing-masing disandi oleh gen CP204L, E183L, B646L, CP530R, and EP402R merupakan protein virus ASF yang paling banyak mendapat perhatian (Gaudreault & Richt 2019; Monteagudo et al. 2017). Protein capsid p72 adalah protein yang paling dominan, sebanyak 31-33% dari protein virus ASF merupakan protein p72, dan bersifat imunogenik (Liu et al. 2019). Antibodi terhadap p72 diyakini memainkan peran penting dalam imun proteksi, karena monoklonal antibodi yang diproduksi terhadap p72 dapat menetralkan infeksi virus ASF. Akan tetapi, kemampuan netralisasi tersebut tidak stabil karena hilang pada isolat virus yang sama setelah dipasase berulang pada kultur sel (Zsak et al. 1993). Tidak diketahui mekanisme netralisasi dan penyebab hilangnya kemampuan netralisasi. Pasase virus ASF pada sel kultur kemungkinan menyebabkan perubahan konformasi protein p72 sehingga tidak lagi mampu menetralkan infeksi virus ASF sekalipun antibodi monoklonal tersebut masih mampu berikatan dengan protein p72 (Borca et al. 1994).

Selain protein p72, protein p30 dan p54 merupakan protein struktural virus ASF yang sangat imunogenik dan antibodi yang diinduksinya juga memiliki aktivitas netralisasi. Protein p30 dan p54 yang diisolasi dari virion akan terikat pada permukaan alveolar makrofag ketika ditambahkan pada suspensi sel tersebut. Kemudian, kedua protein terlepas dari permukaan sel ketika serum konvalesens ditambahkan. Lebih lanjut, serum dari babi yang diimunisasi dengan rekombinan protein p54 dan/atau rekombinan protein p30 memiliki kemampuan menetralkan infeksi virus ASF pada makrofag. Antibodi monospesifik protein p54 menghambat perlekatan virus pada makrofag sedangkan antibodi monospesifik p30 menghambat internalisasi virus. Aktivitas netralisasi antibodi p54 dan p30 secara *in vitro* tidak sebanding dengan yang terjadi secara *in vivo*. Kekebalan protektif yang diperoleh setelah imunisasi dengan protein tersebut pada babi tidak kelihatan atau hanya parsial. Sebuah penelitian melaporkan bahwa babi yang diimunisasi dengan rekombinan protein p54 atau p30 memperlihatkan terbentuknya kekebalan protektif parsial yang ditandai dengan kelambatan timbulnya gejala klinis, penurunan titer viremia, dan penurunan tingkat kematian (Gomez-Puertas et al. 1998). Imunisasi babi dengan kedua protein tetapi dalam bentuk fusi p54/p30 yang diekspresikan oleh *Baculovirus* bahkan memberikan kekebalan protektif lebih tinggi tetapi belum memuaskan. Ketika ditantang dengan virus ASF, babi bertahan dari kematian, gejala

klinis yang lebih ringan dan kemunculannya beberapa hari lebih lambat dan titer viremia yang jauh lebih rendah sekitar 2 log dibandingkan dengan babi kontrol yang tidak divaksin (Barderas et al. 2001).

Protein virus ASF yang juga banyak mendapat perhatian adalah CD2v, yang merupakan glikoprotein transmembran tipe 2 yang disandi oleh gen EP402R. Protein ini merupakan salah satu protein ASF yang paling variabel, tidak vital untuk replikasi virus tetapi sangat penting dalam patogenesis dan imunogenesis virus (Jia et al. 2017). Protein ini terdiri beberapa bagian: bagian *signal peptide*, bagian ekstraseluler, bagian transmembran dan bagian sitoplasmik. Bagian ekstraseluler terdiri dari dua domain dan memiliki kesamaan dengan protein *surface adhesion receptor* CD2 sel T limfosit sehingga dinamai CD2v. Protein CD2v diekspresikan pada stadium akhir infeksi, sebagian dideposit pada membran sel yang terinfeksi, sehingga menyebabkan sel tersebut mampu membentuk *rosette* dengan eritrosit, fenomena yang dikenal sebagai *haemadsorption*. Bagian sitoplasmik CD2v yang memiliki panjang 150 asam amino tidak memiliki kesamaan struktur dengan bagian sitoplasmik protein CD2. Bagian sitoplasmik CD2v dapat berikatan dengan protein SH37P yang berperan dalam *trafficking* dan *signal transduction* pada makrofag sebagai akibatnya signal dari makrofag ke limfosit terganggu sehingga terjadi gangguan respons imun (Dixon et al. 2004).

Selain dideposit pada membran sel yang terinfeksi, protein juga di paking pada selaput terluar (*outer envelope*) virion. Oleh karena protein CD2v inilah, virion dapat melekat pada permukaan eritrosit sehingga virus disebarkan darah ke seluruh tubuh. Oleh karena berperan dalam penyebaran virus, protein CD2v berperan sebagai *virulent enhancement* atau meningkatkan virulen. Klasifikasi serologis virus ASF berdasarkan *haemadsorption inhibition* (HAI) sangat bermanfaat karena proteksi imun pada virus ASF bersifat *HAI- serotype specific* artinya babi yang sembuh dari infeksi atau diimunisasi dengan virus ASF hanya kebal terhadap tantangan virus dengan HAI yang sama (Burmakina et al. 2016; Malogolovkin et al. 2015). Fakta ini menyebabkan perhatian pada CD2v dalam hubungannya dengan pengembangan vaksin sangat besar. Ruiz-Gonzalvo et al. (1996) membuktikan bahwa babi yang diimunisasi dengan protein CD2v berupa rekombinan *baculovirus* memiliki kekebalan yang cukup tangguh. Ketika ditantang dengan virus ASF dosis letal, babi hanya menunjukkan gejala klinis yang ringan (Ruiz-Gonzalvo et al. 1996). Penelitian sebelumnya menggunakan *semipurified* CD2e, diisolasi dari partikel virus menunjukkan kekebalan protektif yang lebih rendah, kendati sebagian bertahan dari kematian ketika ditantang dengan virus ASF (Ruiz-Gonzalvo & Coll 1993). Selain CD2v, protein virus ASF yang juga terlibat dalam proses

*haemadsorption* adalah protein *C-type lectin* atau pEP153R. Seperti CD2v, lectin ini juga tidak esensial untuk replikasi virus tetapi diperlukan virus untuk *immune evasion* dengan cara menghambat apoptosis (Malogolovkin et al. 2015). Pemanfaatan protein ini untuk vaksin kelihatannya belum dilakukan.

Protein virus ASF yang dianggap berperan mengenali reseptornya pada sel hospes adalah protein P12 yang terletak pada lapisan partikel virus paling luar (Carrascosa et al. 1993). Protein p12, baik dalam bentuk rekombinan dengan sistem *Baculovirus* atau diisolasi langsung dari virion mampu menghambat perlekatan virus dengan sel makrofag (Carrascosa et al. 1991&1995). Akan tetapi, babi yang diimunisasi dengan protein tersebut sama sekali tidak terlindungi ketika ditantang dengan virus ASF (Carrascosa et al. 1995). Bahkan spesifik antibodi monoklonal terhadap p12 juga tidak memiliki kemampuan netralisasi (Carrascosa et al. 1991).

Protein p22 merupakan protein membran, disandi oleh gen KP177R dan terletak pada *outer envelope*. Mengingat protein p22 terdapat pada permukaan virion dan diekspresikan pada stadium awal infeksi maka protein ini diduga dapat dijadikan sebagai komponen vaksin (Camacho & Vinuela 1991). Akan tetapi ketika babi diimunisasi dengan protein p22, bahkan dalam bentuk koktail dengan protein p30, p54 dan p72, tidak menginduksi kekebalan protektif (Neilan et al. 2004).

*Receptor binding dan Immune Evasion Proteins*- ASFV menginfeksi dan bereplikasi pada sel myeloid (monosit, macrofage dan antigen presenting cell). Sel-sel ini memainkan peran yang sangat vital dalam respons imun baik humoral ataupun seluler. Infeksi ASFV menghambat fungsi makrofag seperti fagositosis, kemotaksis dan sintesa *reactive oxygen species*, tetapi tidak menghambat ekspresi reseptor Fc dan aktivitas ADCC (*antibody dependant cellular cytotoxicity*) (Martins et al. 1987). Makrofag merupakan kelompok sel yang sangat beragam lokasi, aktivitas, dan responsnya terhadap infeksi virus ASF. Perbedaan ini terlihat dengan jelas dengan alveolar makrofag (AM) yang terdapat pada permukaan alveolus paru-paru dan *pulmonary intravascular macrophage* (PIM). Infeksi pada PIM menimbulkan sekresi IL-1 dan TNF- $\alpha$  yang selanjutnya menimbulkan akumulasi sel netrofil, mikrothrombi, kebocoran pembuluh darah yang berakibat edema dan perdarahan (Carrasco et al. 2002). Respons yang sama tidak terjadi pada alveolar makrofag. Respons yang serupa dengan PIM juga terjadi pada makrofag limpa dan limfoglandula babi yang diinfeksi dengan ASFV virulen, bahkan peningkatan IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 dan TNF $\alpha$  bukan saja terdeteksi pada makrofag pada organ tersebut tetapi juga pada darah atau serum. Kerusakan patologis dan gejala klinis diawali oleh peningkatan sitokin tersebut (Salguero et al. 2002).

Mengingat replikasi ASFV pada sel monosit dan makrofag merupakan langkah awal terjadinya penyakit, penyakit tentunya tidak terjadi apabila replikasi ASFV pada sel ini dapat dicegah, misalnya dengan vaksinasi. Beberapa protein ASFV yang memainkan peran vital dalam infeksi atau replikasi ASFV telah diidentifikasi. Virus ASF memasuki sel makrofag dengan cara endositosis yang dimediasi oleh reseptor (*receptor-mediated endocytosis*) (Sanchez et al. 2017). Reseptor virus pada makrofag belum banyak diketahui tetapi protein virus ASF yang mengenali reseptor telah diketahui, diantaranya protein p12. Rekombinan p12 yang fungsional dan antibodi monoklonal terhadap p12 telah dihasilkan untuk meyakinkan kemungkinan penggunaan p12 sebagai vaksin yang efektif. Rekombinan p12 yang dihasilkan dapat berikatan dengan reseptor sehingga menghambat infeksi sel oleh ASFV. Akan tetapi, antibodi spesifik terhadap p12 baik yang terbentuk pada infeksi alami maupun dihasilkan dengan imunisasi dengan rekombinan p12 tidak mampu menghambat infeksi (Angulo et al. 1993; Carrascosa et al. 1995). Fenomena seperti ini tidak lazim pada kebanyakan penyakit viral. Vaksin yang mengandung protein pengikat reseptor (*receptor binding protein*) seperti hemagglutinin pada virus influenza, spike protein pada virus penyebab SARS, MERS, SARS CoV-2 menginduksi netralisasi antibodi, dan netralisasi antibodi tersebut dapat memberi perlindungan terhadap infeksi (Huang et al. 2020; Jeong et al. 2021).

*Immune evasion* atau kemampuan menghindari sistem imun hospes pada virus ASF juga sangat canggih. Banyak protein virus berperan dalam *immune evasion* yang telah diidentifikasi. Teknik ekspresi diferensial gen pada sel makrofag babi yang diinfeksi virus ASF berhasil mengidentifikasi 5 kelompok gen/protein ASFV yang berperan dalam *immune evasion* tersebut (Zhu et al. 2019). Kelompok pertama adalah protein yang berperan menghambat pemrosesan dan penyajian antigen MHC II, kelompok kedua berfungsi menghindarkan sel efektor CD8<sup>+</sup> T dan neutrofil melalui penurunan ekspresi *chemokine*. kelompok ketiga berfungsi menekan aktivasi makrofag M1, Protein kelompok ke 4 berfungsi menginduksi sitokin yang dapat menghambat sistem imun (*suppressive cytokines*) dan kelompok kelima adalah protein yang menghambat proses autofagi dan apoptosis makrofag. Pemanfaatan keseluruhan protein *immune evasion* sebagai komponen vaksin subunit belum dilakukan. Salah satu kendala dalam pemanfaatannya sebagai vaksin adalah karena jumlahnya sangat banyak. Tidaklah fisibel semua protein dijadikan vaksin, dan kalau hanya sebagian yang digunakan sebagai vaksin, dikhawatirkan tidak akan efektif karena fungsinya akan digantikan oleh protein yang lain.

Sitokin (TNF- $\alpha$ ) yang dihasilkan oleh sel yang terinfeksi virus ASF menyebabkan apoptosis bukan saja pada sel makrofag yang terinfeksi tetapi juga *non-infected* limfosit yang memainkan peran utama dalam pembentukan *adaptive immunity* (Gomez del Moral et al., 1999; Ramiro-Ibanez et al. 1996; Salguero et al. 2005). Pada stadium awal infeksi, apoptosis dihambat; dan penghambatan ini merupakan mekanisme untuk memberi kesempatan ASFV bereplikasi, virus progeni menonjol pada permukaan sel (*progeny budding*) dan tersebar (*release*). Sejumlah protein ASFV yang diekspresikan pada stadium awal infeksi yang berperan menghambat apoptosis telah diidentifikasi, antara lain: Bcl2 homolog (produk gen A179L), *apoptosis Inhibitor protein* (IAP) (produk gen A224L) dan protein *hemadsorption* (produk gen EP153R) (Afonso et al. 1996; Chacon et al. 1995; Hurtado et al. 2004). Selain itu, *multigene family* (MGF) 360 dan 530 sepanjang 11 kbp (kilobase pairs) pada ujung kiri genom juga berfungsi menghambat apoptosis sel yang terinfeksi. *Multigene family* 360 dan 530 dapat hilang karena pasase virus ASF berulang pada kultur sel tetapi kehilangan tidak mengganggu replikasi virus. Hal ini berarti bahwa MGF 360 dan 530 tidak vital bagi virus ASF. Akan tetapi isolat yang kehilangan MGF tersebut membunuh makrofag sangat cepat, bahkan saking cepatnya sebagian makrofag mati sebelum proses replikasi selesai (Zsak et al. 2001).

### WAKSIN SUBUNIT DNA

Peran antibodi dalam proteksi pada ASF tidak diragukan, namun seperti diuraikan diatas, antibodi saja tidak memberikan proteksi yang utuh. proteksi yang utuh membutuhkan sel sitotoksik. Babi yang diimunisasi dengan virus ASF avirulen memiliki kekebalan yang utuh sehingga resisten ketika ditantang dengan virus ASF. Resistensi tersebut hilang ketika sebelum ditantang sel limfosit CD8<sup>+</sup> T dihilangkan (Oura et al. 2005). Kelemahan utama vaksin in-aktif atau vaksin subunit protein adalah ketidak-mampuannya menginduksi respons imun seluler.

Vaksin sub unit DNA yang mengandung gen yang menyandi protein virus ASF mampu menginduksi *antibody-* dan *cell-mediated immunities*. Setelah masuk ke dalam sel, vaksin DNA ditranslasi menjadi protein, sebagian dari protein mengalami proses fragmentasi lalu diekspresikan pada permukaan sel bersama molekul MHC-I untuk menginduksi *cell-mediated immune response* yakni *cytolytic T lymphocytes* dan *T-helper cells*. Sebagian dari protein yang disandi vaksin DNA disekresi keluar sel lalu diambil oleh *antigen presenting cells* kemudian didegradasi menjadi peptida dan disajikan pada permukaan sel oleh molekul MHC-II yang selanjutnya menstimulasi sel B untuk mensintesis antibodi (Liu 2003).

Pengembangan vaksin DNA untuk ASF sudah dilakukan namun sampai saat ini belum memberikan hasil seperti yang diharapkan. Babi yang diimunisasi dengan plasmid yang mengandung gen untuk protein p30 dan p54 tidak mampu menginduksi antibodi. Antibodi spesifik baru terbentuk bila ke dalam plasmid tersebut ditambahkan gen untuk protein ekstraseluler CD2v. Sekalipun demikian, babi yang memiliki antibodi tersebut semuanya mati ketika ditantang dengan virus ASF (Argilaguuet et al. 2011). Penambahan gen ubiquitin ke dalam *construct*, sehingga terekspresikan sebagai fusi protein ubiquitin-CD2v-p30 -p54 mampu meningkatkan imun seluler terutama sel limfosit T CD8<sup>+</sup> tetapi antibodi spesifik tidak terbentuk. Ketika babi yang telah diimunisasi tersebut ditantang dengan virus ASF, hanya sebagian (2 dari 6 ekor) bertahan dari kematian (Argilaguuet et al. 2012). Tingkat proteksi yang lebih tinggi kemungkinan dapat diperoleh seandainya vaksinasi mampu menginduksi *neutralizing specific* antibodi beserta kekebalan seluler, terutama limfosit T CD8<sup>+</sup> spesifik.

Vaksin DNA yang mampu menginduksi respons antibodi dan seluler yang sesuai belum ditemukan. Sunwoo et al. (2019) memformulasi suatu vaksin koktail yang mengandung plasmid DNA yang mengandung gen fusi protein CD2v-p72-p32-17 dan rekombinan protein p15, p35, p54 dan p13. Ketika babi diimunisasi 3 kali dengan vaksin koktail tersebut, antibodi spesifik terhadap rekombinan protein dan spesifik sel imun memang terbentuk tetapi tidak protektif. Ketika babi ditantang dengan virus ASF, penyakit parah timbul bahkan lebih parah dibandingkan dengan babi kontrol yang tidak divaksin. Penyebab infeksi lebih parah pada babi yang divaksin adalah karena antibodi yang terbentuk tidak seperti yang diharapkan tetapi sebaliknya meningkatkan infeksi atau *antibody dependant enhancemet* (ADE) (Sunwoo et al. 2019).

### WAKSIN AKTIF ATENUASI ALAMI

Ciri penyakit ketika virus ASF mewabah di suatu daerah atau negara yang baru adalah perakut atau akut dengan mortalitas yang sangat tinggi, dan virus penyebabnya mempunyai virulensi yang tinggi. Setelah beberapa tahun mewabah, virus mengalami mutasi sehingga timbul populasi virus ASF yang virulensinya rendah. Virus dengan virulensi yang menurun tersebut menimbulkan penyakit yang ringan, kronis atau bahkan subklinis. Virus *strain* NH/P68 (NHV) diisolasi dari babi yang menderita ASF kronis di Portugal tahun 1968, yakni 8 tahun setelah penyakit pertama muncul (Leitao et al. 2001). Virus *strain* NHV memiliki virulensi yang sangat rendah dan hanya menimbulkan penyakit yang sangat ringan ketika diinokulasi kepada babi yang sehat. Babi yang diinfeksi dengan *strain*

NHS menginduksi respons antibodi dan seluler yang spesifik yang mampu memberikan perlindungan yang relatif utuh ketika babi ditantang dengan virus ASF virulen dosis letal (Portugal et al. 2015).

Selain dari babi penderita ASF kronis, virus ASF avirulen juga bisa diisolasi dari caplak babi. Boinas et al. (2004) mengisolasi sejumlah isolat virus ASF dari caplak babi, *Ornithodoros erraticus*, yang dikelompokkan menjadi kelompok yang memiliki aktivitas haemadsorpsi (HAD) dan yang tidak (*non* HAD). Virus yang non HAD tersebut ternyata memiliki virulensi yang sangat rendah. Babi yang diinokulasi dengan virus non HAD tersebut, *strain* OUR83/3, tidak menimbulkan penyakit tetapi membentuk kekebalan yang relatif lengkap (Boinas et al. 2004). Analisis genom virus *strain* OUR83/3 mengungkapkan adanya delesi sepanjang 8-10 kb pada MGF 360 dan mutasi pada gen yang menyandi CD2v dan C-type lectin protein (Chapman et al. 2008).

*Low* atau *avirulent* virus ASF genotype II juga telah diisolasi dari babi hutan buruan di Latvia tahun 2017, yakni sekitar 10 tahun sejak introduksi ASF genotype II di daratan Eropa. Isolat virus avirulen yang diberi nama Lv17/WB/Rie1 juga tidak memiliki aktivitas *hemadsorption*. Hasil sekuens genom menunjukkan delesi *single nucleotide* pada gen *EP402R* yang menyandi protein CD2v. Delesi tersebut menyebabkan *frame shift* sehingga sel yang terinfeksi virus Lv17/WB/Rie1 hanya mengekspresikan *non-functional, truncated* CD2v protein. Babi yang diinokulasi dengan *strain* Lv17/WB/Rie1 tersebut menimbulkan gejala klinis yang ringan atau bahkan tidak terlihat gejala pada sebagian yang lain. Setelah terinfeksi oleh *strain* Lv17/WB/Rie1, babi memiliki kekebalan atau resistensi penuh terhadap virus yang virulen, terbukti dari hasil uji tantang dengan isolat virulen (HAD Latvian) (Gallardo et al. 2019).

### VAKSIN ATENUASI PASASE BERULANG

Sel tropisme virus ASF secara alami sangat sempit yakni sel monosit dan sel makrofag babi tetapi virus tersebut dapat diadaptasikan untuk bereplikasi pada sel lain dan berakibat perubahan genotip dan fenotip seperti penurunan virulensi. Virus ASF *strain* E75 berkurang virulensinya setelah 40 kali pasase pada sel CV1 (*green monkey kidney fibroblast*). *Strain* mutan yang diperoleh, E75CV1, hanya menimbulkan penyakit ringan ketika diinokulasikan pada babi, dan babi yang sembuh dari infeksi mutan ini memiliki resistensi terhadap virus virulen homolog *strain* E75, tetapi tidak resisten terhadap *strain* heterolog BA71 (Lacasta et al. 2015). Pasase berulang pada sel tersebut dapat menghilangkan tropisme virus pada sel makrofag babi, dan bila tropisme tersebut hilang maka virulensi virus juga hilang. Teknik pasase berulang ini sederhana dan

telah digunakan untuk tujuan menemukan biang vaksin aktif ASF. Rodriguez et al. (2015) mem pasase berulang virus ASF virulen *strain* BA71 pada sel CV1 dan memperoleh *strain* baru BA71V yang tidak lagi virulen setelah pasase ke 36. Akan tetapi *strain* virus yang baru tersebut sama sekali tidak memiliki kemampuan menginduksi kekebalan protektif pada babi sekalipun terhadap virus tua yakni *strain* BA71. Hasil seperti ini tidak diduga karena perubahan genom yang menyebabkan kehilangan virulensi virus tersebut sangat sedikit (Rodriguez et al. 2015). Atenuasi berulang virus virulen *strain* Georgia pada sel Vero menyebabkan kehilangan virulensinya pada pasase yang lebih tinggi yakni pasase ke-110. Virus yang sudah di atenuasi ini juga tidak mampu menginduksi kekebalan protektif pada babi (Krug et al. 2015). Analisis keseluruhan genom virus yang atenuasi ini berbeda dengan sebelumnya (Rodriguez et al. 2015). Atenuasi pada virus *strain* Georgia menyebabkan delesi yang signifikan secara bertahap dan terakumulasi di tempat tertentu pada ujung variabel kanan dan kiri genom. Atenuasi berulang juga menyebabkan mutasi berupa substitusi asam amino dan *frameshift* pada beberapa gen (Krug et al. 2015).

Vaksin ASF asal atenuasi pasase berulang telah diaplikasikan pada peternakan babi di Portugal dan Spanyol tahun 1960 an. Hasil vaksinasi tidak seperti diharapkan karena vaksin aktif sekalipun dalam percobaan di laboratorium tidak virulen masih menimbulkan penyakit ketika diaplikasikan di peternakan. Sebanyak 7% dari babi yang divaksin menderita sakit dengan gejala pneumonia, gangguan gerak dan ulserasi kulit (Munoz-Perez et al. 2021). Kejadian ini menyebabkan penghentian penggunaan vaksin atenuasi pasase berulang.

### VAKSIN ATENUASI DELESI GEN

Persoalan utama yang dihadapi dalam penggunaan vaksin aktif atenuasi alami atau pasase berulang adalah masih sering menjadi virulen ketika diaplikasikan di lapangan atau kehilangan kemampuannya menginduksi kekebalan protektif bila dipasase berlebihan. Harapan untuk dapat mengatasi persoalan diatas timbul dengan berkembangnya teknik molekuler yang mampu mendelesi gen secara presisi.

Pengetahuan tentang segmen genom yang harus didelesi untuk menghilangkan virulensi virus ASF telah banyak diketahui. Hasil komparasi genom virus virulen dengan yang avirulen, baik yang natural maupun yang diperoleh melalui pasase berulang, mengungkapkan bahwa terjadi delesi segmen genom pada virus yang avirulen. Segmen genom yang terdelesi beragam tetapi pada umumnya terjadi pada bagian genom variabel terutama pada kelompok MGF. Segmen tersebut mempunyai peran dalam patogenitas atau *immune*

*evasion* (Rodriguez et al. 2015). Atenuasi virus dengan cara mendelesi gen yang bertanggung jawab terhadap patogenitas menggunakan teknologi molekuler memberikan harapan, terlebih dengan tersedianya teknik molekuler yang lebih efisien untuk gen delesi. Berbeda dengan teknik pasase berulang, teknik molekuler mendelesi gen secara terarah dan spesifik.

Teknik rekombinasi homolog atau teknik CRISPR/cas 9 adalah teknik molekuler yang telah dipakai untuk delesi gen pada virus ASF. Neilan et al berhasil mendelesi gen atau ORF 4CL dengan teknik rekombinasi homolog (Neilan et al. 1997). Awalnya produk ORF 4CL diduga berperan sebagai *inhibitor* apoptosis sehingga bila gen ini didelesi virus kehilangan virulensinya dan dapat dijadikan sebagai vaksin aktif. Akan tetapi, dugaan tersebut meleset karena virus yang telah kehilangan ORF 4CL tidak berubah kemampuannya dibandingkan dengan virus asalnya dalam menginduksi apoptosis pada sel makrofag dan virulensinya pada babi. Dugaan ini didasarkan pada fakta bahwa ORF 4CL mengandung motif BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis motif*).

Gen 8DR yang menyandi protein CD2v juga telah berhasil di delesi menggunakan teknik rekombinasi homolog pada virus ASF ganas *strain* Malawi Lil-20/1 (Borca et al. 1998). Teknik ini menghasilkan delesi hanya pada gen 8DR dan tidak menimbulkan mutasi pada genom bagian lain. Ketika mutan ASF- $\Delta$ 8DR diinokulasi pada babi replikasinya menurun secara signifikan yang ditandai dengan penurunan titer virus sampai 10.000 kali pada darah dan 1000 kali pada limfoglandula. Akan tetapi virus mutan ASF - $\Delta$ 8DR ini masih ganas, patogenitasnya masih sama dengan *strain* induk Malawi Lil-20/1, sehingga tidak memungkinkan digunakan sebagai vaksin.

Gen NL-S yang diduga berperan sebagai *host range gen* juga telah didelesi pada virus ASF *strain* E-70 (Zsak et al. 1996). Sesuai dengan dugaan, delesi gen NL-S tidak menimbulkan gangguan replikasi virus pada sel makrofag. Virulensi virus mutan jauh menurun sehingga inokulasi pada babi tidak menimbulkan kematian, gejala klinis yang nampak hanya demam ringan, dan viremia muncul lebih lambat dengan titer berkurang sampai 1000 kali. Babi yang sebelumnya diinokulasi dengan mutan virus ASF $\Delta$ NL-S bertahan terhadap infeksi tantang dengan virus induk (E-70) dosis letal. Tepat disebelah atas gen NL-S terdapat gen UK yang berperan dalam virulensi virus dan tidak esensial untuk replikasi virus. Delesi gen UK pada virus ASF *strain* E70, mutan E70 $\Delta$ UK, tidak menyebabkan gangguan replikasi pada biakan sel makrofag tetapi ketika diinokulasikan pada babi terjadi penurunan titer viremia 300 – 1000 kali dibandingkan dengan virus induknya *strain* E70. Inokulasi virus mutan pada babi tidak menimbulkan kematian tetapi demam dan gejala klinis, sekalipun jauh lebih ringan,

masih muncul. Setelah sembuh, reinfeksi dengan virus induk *strain* E70 tidak menimbulkan penyakit (Zsak et al. 1998).

Teknik rekombinasi homolog juga telah digunakan untuk mendelesi gen *thymidine kinase* virus ASF *strain* Malawi Lil-20/1 dan *strain* Haiti (Moore et al. 1998). Oleh karena produk gen ini berperan dalam sintesis DNA virus, maka delesi gen, seperti diduga, mengganggu replikasi virus pada sel makrofag. Virulensi virus mutan jauh menurun dibandingkan dengan virus induk tetapi masih mampu menimbulkan demam dan viremia bahkan kematian pada beberapa babi.

Gen 9GL (B119L) virus ASF juga berhasil didelesi dengan cara rekombinasi homolog antara gen 9GL virus ASF *strain* Malawi Lil-20/1 dengan sebuah vektor transfer rekombinasi yang mengandung insert gen reporter  $\beta$ -glucuronidase pada sel makrofag babi (Lewis et al. 2000). Gen 9GL yang menyandi protein nonstruktural p14 yang berperan dalam fosforilasi oksidatif sangat *conserved* pada isolat virus ASF. Delesi gen ini menyebabkan gangguan yang sangat besar pada maturasi virus pada sel makrofag sehingga kehilangan virulensinya. Inokulasi virus mutan ASF $\Delta$ 9GL pada babi hanya menyebabkan demam ringan pada beberapa babi. Babi yang pernah terinfeksi dengan virus mutan ASF $\Delta$ 9G tidak menunjukkan gejala sakit ketika ditantang dengan virus induk Malawi Lil-20/1 dosis letal. Sekalipun gen Gen 9GL (B119L) sangat *conserved*, dampak dari delesi gen tersebut tidak. O'Donnell et al. (2015b) mendelesi gen 9GL pada virus ASF *strain* Georgia dengan cara yang sama seperti diuraikan diatas pada *strain* Malawi Lil-20/1 menghasilkan mutan yang masih virulen sekalipun mengalami gangguan pertumbuhan pada sel makrofag dan patogenitasnya berkurang pada dosis rendah (O'Donnell et al. 2015b).

Delesi gen untuk mendapatkan mutan virus ASF yang nonvirulen tapi menginduksi kekebalan protektif pada virus ASF genotipe 2 kelihatannya jauh lebih sulit dibandingkan dengan genotipe 1 (Tabel 1 dan 2). Pada genotipe II *strain* Georgia, atenuasi mutan ASF $\Delta$ 9GL mejadi komplis hanya setelah gen UK juga turut dilesi. Delesi kedua gen dilakukan dengan teknik rekombinasi homolog secara sekuensial. Sepanjang 173 nucleotida gen 9GL didelesi dan digantikan dengan gen  *$\beta$ -glucuronidase* plus promoter p72, dan 255 nucleotida gen UK didelesi dan disubstitusi dengan gen protein *mCherry plus* promoter p72 (O'Donnell et al. 2016). Mutan yang diperoleh, ASFVG $\Delta$ 9GL- $\Delta$ UK, tidak menimbulkan penyakit ketika diinokulasi pada babi sekalipun dengan dosis yang tinggi, yakni  $10^6$  HAD<sub>50</sub>. Imunisasi babi dengan dosis  $10^4$  HAD<sub>50</sub> memberikan perlindungan yang utuh setelah 14 hari pasca imunisasi.

**Tabel 1.** Dampak delesi gen pada genom virus *African swine fever* genotipe I terhadap virulensi dan kemampuan menginduksi kekebalan protektif pada babi

| Gen yang didelesi        | Strain/ Isolat virus ASF         | Virulensi atau patogenitas mutan                       | Proteksi        | Referensi                  |
|--------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------|----------------------------|
| 8DR                      | Malawi Lil-20/1                  | masih virulen                                          | tidak ada data  | Borca et al. 1998          |
| NL                       | E-70                             | ringan berupa demam ringan dan viremia                 | hampir komplrit | Zsak et al. 1996           |
| NL                       | Malawi Lil-20/1                  | masih virulen                                          | tidak ada data  | Afonso et al. 1998         |
| NL                       | Pretoriuskop/96/4                | masih virulen                                          | tidak ada data  | Afonso et al. 1998         |
| UK                       | E-70                             | ringan berupa demam ringan dan viremia                 | hampir komplrit | Zsak et al. 1998           |
| TK (A240L)               | Malawi Lil-20/1 dan strain Haiti | ringan berupa demam ringan, viremia, mortalitas rendah | hampir komplrit | Moore et al. 1998          |
| 9GL (B119L)              | Malawi Lil-20/1                  | atenuasi hampir komplrit                               | hampir komplrit | Lewis et al. 2000          |
| MGF360 dan 505           | Benin 97/1                       | ringan berupa demam ringan, viremia, mortalitas rendah | hampir komplrit | Sanchez-Cordon et al. 2018 |
| DP148R                   | Benin 97/1                       | <i>attenuated</i>                                      | hampir komplrit | Reis et al. 2017           |
| CD2v (EP402R)            | BA71                             | <i>attenuated</i>                                      | hampir komplrit | Monteagudo et al. 2017     |
| DP71L (NL) & DP96GR (UK) | virulensi rendah OUR T88/3       | tidak virulen                                          | proteksi hilang | Abrams et al. 2013         |

**Tabel 2.** Dampak delesi gen pada genom virus *African swine fever* genotipe II terhadap virulensi dan kemampuan menginduksi kekebalan protektif pada babi

| Gen yang didelesi                                | Strain/isolat virus ASF | Virulensi atau patogenitas mutan    | Proteksi                                               | Referensi                  |
|--------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------|
| TK (A240L)                                       | Georgia                 | patogenik ringan                    | tidak protektif                                        | Sanford et al. 2016        |
| 9GL (B119L)                                      | Georgia                 | patogenik ringan                    | protektif                                              | O'Donnell et al. 2015b     |
| 9GL & UK                                         | Georgia                 | patogenik ringan                    | komplrit                                               | O'Donnell et al. 2016      |
| DP96GR (UK)                                      | Georgia                 | Virulen                             | tidak ada data                                         | Ramirez-Medina et al. 2019 |
| DP71L (NL)                                       | Georgia                 | bervariasi (tidak virulen -virulen) | tidak ada data                                         | Ramirez-Medina et al. 2019 |
| C962R                                            | Georgia                 | virulen                             | tidak ada data                                         | Ramirez-Medina et al. 2020 |
| MGF530 (1R, 2R, 3R); MGF360 (12L, 13L, 14L)      | Georgia                 | tidak virulen                       | komplrit                                               | O'Donnell et al. 2015a     |
| DP148R                                           | Pig/Heilongjiang/ 2018  | virulen                             | tidak ada data                                         | Chen et al. 2020           |
| CD2v                                             | Pig/Heilongjiang/ 2018  | virulensinya sedikit berkurang      | tidak ada data                                         | Chen et al. 2020           |
| CD2v + UK                                        | Pig/Heilongjiang/ 2018  | virulensinya sedikit berkurang      | tidak ada data                                         | Chen et al. 2020           |
| 9GL& UK,                                         | Pig/Heilongjiang/ 2018  | <i>attenuated</i>                   | tidak terproteksi                                      | Chen et al. 2020           |
| MGF530 (1R, 2R, 3R); MGF360 (12L, 13L, 14L)      | Pig/Heilongjiang/ 2018  | <i>attenuated</i>                   | terproteksi tetapi mutan bisa berbalik menjadi virulen | Chen et al. 2020           |
| MGF530 (1R, 2R, 3R); MGF360 (12L, 13L, 14L) CD2v | Pig/Heilongjiang/ 2018  | tidak virulen                       | terproteksi dan mutan stabil tidak virulen             | Chen et al. 2020           |

Babi yang diinokulasi dengan ASFVGΔ9GL-ΔUK membentuk antibodi spesifik yang titernya berkorelasi dengan derajat kekebalan. Tambahan delesi gen NL (DP71L) pada mutan ASFVGΔ9GL-ΔUK ini menyebabkan kemampuan bereplikasi mutan ini (ASFVGΔ9GL-ΔUK-ΔNL) 100 kali lebih rendah dibandingkan virus induknya ASFVGΔ9GL-ΔUK atau 1000 kali lebih rendah dibanding virus neneknya, *strain* Georgia (Ramirez-Medina et al. 2019). Inokulasi mutan delesi *triple* gen pada babi tidak menimbulkan penyakit dan hanya dengan titer viremia yang sangat rendah, dan sebagai konsekuensinya antibodi yang terbentuk juga rendah. Akibatnya, babi yang diimunisasi dengan ASFVGΔ9GL-ΔUK-ΔNL tidak memiliki kekebalan terhadap infeksi tantang dengan virus ASF *strain* Georgia (ASFV-G).

Hasil yang sama tidak diperoleh ketika dilakukan pada virus ASF isolat China Pig/Heilongjiang/2018 sekalipun isolat ini masih satu klaster dengan *strain* Georgia. Mutan yang tidak virulen dan mampu menginduksi kekebalan protektif pada pada genom isoolat Pig/Heilongjiang/2018 baru terjadi setelah dilakukan delesi pada 7 gen, MGF530 (1R, 2R, 3R); MGF360 (12L, 13L, 14L) CD2v. Ketujuh gen tersebut harus didelesi karena bila delesi hanya pada 6 gen, yakni tanpa delesi gen CD2v, mutan yang terbentuk tidak stabil karena dapat berbalik menjadi virulen (Chen et al. 2020). Hasil uji lapangan menunjukkan bahwa vaksin mutan delesi 7 gen tersebut stabil dan tidak ada kecenderungan untuk berbalik menjadi virulen. Oleh karena itu, mutan delesi 7 gen tersebut diharapkan dapat dijadikan vaksin dan digunakan secara meluas. Uji lapang yang lebih luas, melibatkan berbagai negara masih perlu dilakukan sebelum vaksin diproduksi secara komersial.

## KESIMPULAN

Penyakit *African swine fever* (AFS) telah menyebar di Indonesia dan negara tetangga. Penerapan biosekuriti dan *stamping out* yang ketat merupakan keharusan karena virus dapat bertahan lama sekalipun dalam lingkungan yang ekstrim. Cara ini tidak mungkin diterapkan di Indonesia. Oleh karena itu ketersediaan vaksin untuk menanggulangi penyakit sangat dibutuhkan. Virus ASF sangat kompleks dan mempunyai cara yang ampuh melumpuhkan sistem imunitas. Berbagai format vaksin in-aktif, vaksin subunit protein, vaksin subunit DNA, vaksin aktif atenuasi alami atau pasase berulang telah dikembangkan sejak penyakit ASF ditemukan namun tidak ada satupun yang efektif. Vaksin aktif berupa virus ASF yang diatenuasi dengan delesi tujuh gen pengendali virulensi dan *immune evasion* memberi harapan namun ketersediaannya masih menunggu pengujian keamanan yang cukup panjang.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abrams CC, Goatley L, Fishbourne E, Chapman D, Cooke L, Oura CA, Netherton CL, Takamatsu HH, Dixon LK. 2013. Deletion of virulence associated genes from attenuated African swine fever virus isolate OUR T88/3 decreases its ability to protect against challenge with virulent virus. *Virology*. 443:99-105.
- Afonso CL, Neilan JG, Kutish GF, Rock DL. 1996. An African swine fever virus Bc1-2 homolog, 5-HL, suppresses apoptotic cell death. *J Virol*. 70:4858-4863.
- Afonso CL, Zsak L, Carrillo C, Borca MV, Rock DL. 1998. African swine fever virus NL gene is not required for virus virulence. *J Gen Virol*. 79:2543-2547.
- Angulo A, Vinuela E, Alcamí A. 1993. Inhibition of African swine fever virus binding and infectivity by purified recombinant virus attachment protein p12. *J Virol*. 67:5463-5471.
- Argilaguet JM, Perez-Martin E, Gallardo C, Salguero FJ, Borrego B, Lacasta A, Accensi F, Diaz I, Nofrarias M, Pujols J, Blanco E, Perez-Filgueira M, Escibano JM, Rodriguez F. 2011. Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells. *Vaccine*. 29:5379-5385.
- Argilaguet JM, Perez-Martin E, Nofrarias M, Gallardo C, Accensi F, Lacasta A, Mora M, Ballester M, Galindo-Cardiel I, Lopez-Soria S, Escibano JM, Reche PA, Rodriguez F. 2012. DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies. *PLoS One*. 7:e40942.
- Blome S, Gabriel C, Beer M. 2014. Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation. *Vaccine*. 32: 3879-3882.
- Boinas FS, Hutchings GH, Dixon LK, Wilkinson PJ. 2004. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J Gen Virol*. 85:2177-2187.
- Borca MV, Carrillo C, Zsak L, Laegreid WW, Kutish GF, Neilan JG, Burrage TG, Rock DL. 1998. Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. *J Virol*. 72:2881-2889.
- Borca MV, Irusta P, Carrillo C, Afonso CL, Burrage T, Rock DL. 1994. African swine fever virus structural protein p72 contains a conformational neutralizing epitope. *Virology*. 201:413-418.
- Burmakina G, Malogolovkin A, Tulman ER, Zsak L, Delhon G, Diel DG, Shobogorov NM, Morgunov YP, Morgunov SY, Kutish GF, Kolbasov D, Rock DL. 2016. African swine fever virus serotype-specific proteins are significant protective antigens for African swine fever. *J Gen Virol*. 97:1670-1675.

- Camacho A, Vinuela E. 1991. Protein p22 of African swine fever virus: an early structural protein that is incorporated into the membrane of infected cells. *Virology*. 181:251-257.
- Carrasco L, Nunez A, Salguero FJ, Diaz San Segundo F, Sanchez-Cordon P, Gomez-Villamandos JC, Sierra MA. 2002. African swine fever: Expression of interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor-alpha by pulmonary intravascular macrophages. *J Comp Pathol*. 126:194-201.
- Carrascosa AL, Saastre I, Gonzalez P, Vinuela E. 1993. Localization of the African swine fever virus attachment protein P12 in the virus particle by immunoelectron microscopy. *Virology*. 193:460-465.
- Carrascosa AL, Sastre I, Vinuela E. 1991. African swine fever virus attachment protein. *J Virol*. 65:2283-2289.
- Carrascosa AL, Sastre I, Vinuela E. 1995. Production and purification of recombinant African swine fever virus attachment protein p12. *J Biotechnol*. 40:73-86.
- Chacon MR, Almazan F, Nogal, ML, Vinuela E, Rodriguez, JF. 1995. The African swine fever virus IAP homolog is a late structural polypeptide. *Virology*. 214:670-674.
- Chapman DAG, Tcherepanov V, Upton C, Dixon LK. 2008. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. *J Gen Virol*. 89:397-408.
- Chen W, Zhao D, He X, Liu R, Wang Z, Zhang X, Li F, Shan D, Chen H, Zhang J, Wang L, Wen Z, Wang X, Guan Y, Liu J, Bu Z. 2020. A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs. *Sci China Life Sci*. 63: 623-634.
- de Kock G, Robinson EM, Keppel JGG. 1940. Swine fever in South Africa. *Onderstepoort J Vet Sci Anim Industry*. 14:31-93.
- Dharmayanti NLPI, Sendow I, Ratnawati A, Settypalli TBK, Saepulloh M, Dundon WG, Nuradji H, Naletoski I, Cattoli G, Lamien CE. 2021. African swine fever in North Sumatra and West Java provinces in 2019 and 2020, Indonesia. *Transbound Emerg Dis*. 68:2890-2896.
- Dixon LK, Abrams CC, Bowick G, Goatley LC, Kay-Jackson PC, Chapman D, Liverani E, Nix R, Silk R, Zhang F. 2004. African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Vet Immunol Immunopathol*. 100:117-134.
- Forman AJ, Wardley RC, Wilkinson PJ. 1982. The immunological response of pigs and guinea pigs to antigens of African swine fever virus. *Arch Virol*. 74:91-100.
- Gallardo C, Soler A, Rodze I, Nieto R, Cano-Gomez C, Fernandez-Pinero J, Arias M. 2019. Attenuated and non-haemadsorbing (non-HAD) genotype II African swine fever virus (ASFV) isolated in Europe, Latvia 2017. *Transbound Emerg Dis*. 66:1399-1404.
- Gaudreault NN, Richt JA. 2019. Subunit vaccine approaches for African Swine Fever virus. *Vaccines (Basel)* 7:56.
- Gomez del Moral M, Ortuno E, Fernandez-Zapatero P, Alonso F, Alonso C, Ezquerro A, Dominguez J. 1999. African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: implications in pathogenesis. *J Virol*. 73:2173-2180.
- Gomez-Puertas P, Rodriguez F, Oviedo JM, Brun A, Alonso C, Escribano JM. 1998. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology*. 243:461-471.
- Huang J, Huang H, Wang D, Wang C, Wang Y. 2020. Immunological strategies against spike protein: Neutralizing antibodies and vaccine development for COVID-19. *Clin Transl Med*. 10:e184.
- Hurtado C, Granja AG, Bustos MJ, Nogal ML, Gonzalez de Buitrago G, de Yebenes VG, Salas ML, Revilla Y, Carrascosa, AL. 2004. The C-type lectin homologue gene (EP153R) of African swine fever virus inhibits apoptosis both in virus infection and in heterologous expression. *Virol*. 326:160-170.
- Jeong H, Lee CS, Lee J, Lee J, Hwang HS, Lee M, Na K. 2021. Hemagglutinin nanoparticulate vaccine with controlled photochemical immunomodulation for pathogenic influenza-specific immunity. *Adv Sci*. 8:e2100118.
- Jia N, Ou Y, Pejsak Z, Zhang Y, Zhang J. 2017. Roles of African swine fever virus structural proteins in viral infection. *J Vet Res*. 61: 135-143.
- Krug PW, Holinka LG, O'Donnell V, Reese B, Sanford B, Fernandez-Sainz I, Gladue DP, Arzt J, Rodriguez L, Risatti GR, Borca MV. 2015. The progressive adaptation of a georgian isolate of African swine fever virus to vero cells leads to a gradual attenuation of virulence in swine corresponding to major modifications of the viral genome. *J Virol*. 89:2324-2332.
- Lacasta A, Monteagudo PL, Jimenez-Marin A, Accensi F, Ballester M, Argilague J, Galindo-Cardiel I, Segales J, Salas ML, Dominguez J, Moreno A, Garrido JJ, Rodriguez F. 2015. Live attenuated African swine fever viruses as ideal tools to dissect the mechanisms involved in viral pathogenesis and immune protection. *Vet Res*. 46:135.
- Leitao A, Cartaxeiro C, Coelho R, Cruz B, Parkhouse RM, Portugal F, Vigario JD, Martins CL. 2001. The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *J Gen Virol*. 82:513-523.
- Lewis T, Zsak L, Burrage TG, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Rock DL. 2000. An African swine fever virus ERV1-ALR homologue, 9GL, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine. *J Virol*. 74:1275-1285.

- Liu MA. 2003. DNA vaccines: a review. *J Intern Med.* 253:402-410.
- Liu Q, Ma B, Qian N, Zhang F, Tan X, Lei J, Xiang Y. 2019. Structure of the African swine fever virus major capsid protein. *Cell Res.* 29:953–955.
- Malogolovkin A, Burmakina G, Tulman ER, Delhon G, Diel DG, Salnikov N, Kutish GF, Kolbasov D, Rock DL. 2015. African swine fever virus CD2v and C-type lectin gene loci mediate serological specificity. *J Gen Virol.* 96:866-873.
- Martins CL, Leitao AC. 1994. Porcine immune responses to African swine fever virus (ASFV) infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 43: 99-106.
- Martins CL, Scholl T, Mebus CA, Fisch H, Lawman MJ. 1987. Modulation of porcine peripheral blood-derived macrophage functions by in vitro infection with African swine fever virus (ASFV) isolates of different virulence. *Viral Immunol.* 1:177-190.
- Monteagudo PL, Lacasta A, Lopez E, Bosch L, Collado J, Pina-Pedrero S, Correa-Fiz F, Accensi F, Navas MJ, Vidal E, Bustos MJ, Rodriguez JM, Gallei A, Nikolin V, Salas ML, Rodriguez F. 2017. BA71DeltaCD2: a New recombinant live attenuated African swine fever virus with cross-Protective capabilities. *J Virol.* 91:e01058-17.
- Moore DM, Zsak L, Neilan JG, Lu Z, Rock DL. 1998. The African swine fever virus thymidine kinase gene is required for efficient replication in swine macrophages and for virulence in swine. *J Virol.* 72:10310-10315.
- Munoz-Perez C, Jurado C, Sanchez-Vizcaino JM. 2021. African swine fever vaccine: Turning a dream into reality. *Transbound Emerg Dis.* 68:2756-2668.
- Neilan JG, Lu Z, Kutish GF, Zsak L, Burrage TG, Borca MV, Carrillo C, Rock DL. 1997. A BIR motif containing gene of African swine fever virus, 4CL, is nonessential for growth in vitro and viral virulence. *Virol.* 230:252-264.
- Neilan JG, Zsak L, Lu Z, Burrage TG, Kutish GF, Rock DL. 2004. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virol.* 319:337-342.
- O'Donnell V, Holinka LG, Gladue DP, Sanford B, Krug PW, Lu X, Arzt J, Reese B, Carrillo C, Risatti GR, Borca MV. 2015a. African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of MGF360 and MGF505 genes is attenuated in swine and confers protection against challenge with virulent parental virus. *J Virol.* 89:6048-6056.
- O'Donnell V, Holinka LG, Krug PW, Gladue DP, Carlson J, Sanford B, Alfano M, Kramer E, Lu Z, Arzt J, Reese B, Carrillo C, Risatti GR, Borca MV. 2015b. African Swine fever virus Georgia 2007 with a deletion of virulence-associated gene 9GL (B119L), when administered at low doses, leads to virus attenuation in swine and induces an effective protection against homologous challenge. *J Virol.* 89:8556-8566.
- O'Donnell V, Holinka LG, Sanford B, Krug PW, Carlson J, Pacheco JM, Reese B, Risatti GR, Gladue DP, Borca MV. 2016. African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of 9GL and MGF360/505 genes is highly attenuated in swine but does not confer protection against parental virus challenge. *Virus Res.* 221:8-14.
- Oura CAL, Denyer MS, Takamatsu H, Parkhouse RME. 2005. In vivo depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus. *J Gen Virol.* 86:2445-2450.
- Portugal R, Coelho J, Hoper D, Little NS, Smithson C, Upton C, Martins C, Leitao A, Keil GM. 2015. Related strains of African swine fever virus with different virulence: genome comparison and analysis. *J Gen Virol.* 96:408-419.
- Ramirez-Medina E, Vuono E, O'Donnell V, Holinka LG, Silva E, Rai A, Pruitt S, Carrillo C, Gladue DP, Borca MV. 2019. Differential effect of the deletion of African swine fever virus virulence-associated genes in the induction of attenuation of the highly virulent Georgia strain. *Viruses.* 11:599
- Ramirez-Medina E, Vuono EA, Rai A, Pruitt S, Silva E, Velazquez-Salinas L, Zhu J, Borca MV, Gladue DP. 2020. The C962R ORF of African swine fever strain Georgia is non-essential and not required for virulence in swine. *Viruses.* 12:60.
- Ramiro-Ibanez F, Ortega A, Brun A, Escribano JM, Alonso C. 1996. Apoptosis: a mechanism of cell killing and lymphoid organ impairment during acute African swine fever virus infection. *J Gen Virol.* 77:2209-2219.
- Reis AL, Goatley LC, Jabbar T, Sanchez-Cordon PJ, Netherton CL, Chapman DAG, Dixon LK. 2017. Deletion of the African swine fever virus gene DP148R does not reduce virus replication in culture but reduces levels of protection against challenge. *J Virol.* 91(24): e01428-17.
- Rodriguez JM, Moreno LT, Alejo A, Lacasta A, Rodriguez F, Salas ML. 2015. Genome Sequence of African Swine Fever Virus BA71, the virulent parental strain of the nonpathogenic and tissue-culture adapted BA71V. *PLoS One.* 10:e0142889.
- Ruiz-Gonzalvo F, Coll JM. 1993. Characterization of a soluble hemagglutinin induced in African swine fever virus-infected cells. *Virol.* 196:769-777.
- Ruiz-Gonzalvo F, Rodriguez F, Escribano JM. 1996. Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus. *Virol.* 218:285-289.
- Salguero FJ, Ruiz-Villamor E, Bautista MJ, Sanchez-Cordon PJ, Carrasco L, Gomez-Villamandos JC. 2002. Changes in macrophages in spleen and lymph nodes during acute African swine fever: expression of cytokines. *Vet Immunol Immunopathol.* 90:11-22.

- Salguero FJ, Sanchez-Cordon PJ, Nunez A, Fernandez de Marco M, Gomez-Villamandos JC. 2005. Proinflammatory cytokines induce lymphocyte apoptosis in acute African swine fever infection. *J Comp Pathol.* 132:289-302.
- Sanchez EG, Perez-Nunez D, Revilla Y. 2017. Mechanisms of entry and endosomal pathway of African swine fever virus. *Vaccines.* 5:42.
- Sanchez-Cordon PJ, Jabbar T, Berrezaie M, Chapman D, Reis A, Sastre P, Rueda P, Goatley L, Dixon LK. 2018. Evaluation of protection induced by immunisation of domestic pigs with deletion mutant African swine fever virus BeninDeltaMGF by different doses and routes. *Vaccine.* 36:707-715.
- Sanford B, Holinka LG, O'Donnell V, Krug PW, Carlson J, Alfano M, Carrillo C, Wu P, Lowe A, Risatti GR, Gladue DP, Borca MV. 2016. Deletion of the thymidine kinase gene induces complete attenuation of the Georgia isolate of African swine fever virus. *Virus Res.* 213:165-171.
- Schlafer DH, McVicar JW, Mebus CA. 1984. African swine fever convalescent sows: subsequent pregnancy and the effect of colostral antibody on challenge inoculation of their pigs. *Am J Vet Res.* 45:1361-1366.
- Sendow I, Ratnawati A, Dharmayanti NLPI, Saepullo M. 2020. African Swine Fever: penyakit emerging yang mengancam peternakan babi di dunia. *Wartazoa.* 30:14-24.
- Stone SS, Hess WR. 1967. Antibody response to inactivated preparations of African swine fever virus in pigs. *Am J Vet Res.* 28:475-481.
- Sunwoo SY, Perez-Nunez D, Morozov I, Sanchez EG, Gaudreault NN, Trujillo JD, Mur L, Nogal M, Madden D, Urbaniak K, Kim IJ, Ma W, Revilla Y, Richt JA. 2019. DNA-protein vaccination strategy does not protect from challenge with African swine fever virus armenia 2007 strain. *Vaccines.* 7:12.
- Zhu JJ, Ramanathan P, Bishop EA, O'Donnell V, Gladue DP, Borca MV. 2019. Mechanisms of African swine fever virus pathogenesis and immune evasion inferred from gene expression changes in infected swine macrophages. *PLoS One.* 14:e0223955.
- Zsak L, Caler E, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Rock DL. 1998. A nonessential African swine fever virus gene UK is a significant virulence determinant in domestic swine. *J Virol.* 72:1028-1035.
- Zsak L, Lu Z, Burrage TG, Neilan JG, Kutish GF, Moore DM, Rock DL. 2001. African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes are novel macrophage host range determinants. *J Virol.* 75:3066-3076.
- Zsak L, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Rock DL. 1996. An African swine fever virus virulence-associated gene NL-S with similarity to the herpes simplex virus ICP34.5 gene. *J Virol.* 70:8865-8871.
- Zsak L, Onisk DV, Afonso CL, Rock DL. 1993. Virulent African swine fever virus isolates are neutralized by swine immune serum and by monoclonal antibodies recognizing a 72-kDa viral protein. *Virol.* 196:596-602.