

Isolasi dan Karakterisasi Virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* Subtipe H5 dari Ayam Asal Wabah di Indonesia

AGUS WIYONO, R. INDRIANI, N.L.P.I. DHARMAYANTI, R. DAMAYANTI, L. PAREDE, T. SYAFRIATI dan DARMINTO

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 16 Agustus 2004)

ABSTRACT

WIYONO, A., R. INDRIANI, N.L.P.I. DHARMAYANTI, R. DAMAYANTI, L. PAREDE, T. SYAFRIATI dan DARMINTO. 2004. Isolation and characterization of virus of highly pathogenic avian influenza H5 subtype of chicken from outbreaks in Indonesia. *JITV* 9(1): 61-71.

A study on the isolation and characterization of Highly Pathogenic Avian Influenza of chicken from outbreaks in Indonesia was conducted at Indonesian Research Institute for Veterinary Science. Outbreaks of avian disease had been reported in Indonesia since August 2003 affecting commercial layer, broiler, quail, and ostrich and also native chicken with showing clinical signs such as cyanosis of wattle and comb, nasal discharges and hypersalivation, subcutaneous ptechiae on foot and leg, diarrhea and sudden high mortality. The aim of this study is to isolate and characterize the causal agent of the disease. Samples of serum, feather follicle, tracheal swab, as well as organs of proventriculus, intestine, *caecal tonsil*, trachea and lungs were collected from infected animals. Serum samples were tested haemagglutination/haemagglutination inhibition to Newcastle Disease and Egg Drop Syndrome viruses. Isolation of virus of the causal agent of the outbreak was conducted from samples of feather follicle, tracheal swab, and organs using 11 days old *specific pathogen free* (SPF) embryonated eggs. The isolated viruses were then characterised by agar gel precipitation test using swine influenza reference antisera, by haemagglutination inhibition using H1 to H15 reference antisera, and by electron microscope examination. The pathogenicity of the viruses was confirmed by intravenous pathogenicity index test and its culture in Chicken Embryo Fibroblast primary cell culture without addition of trypsin. The study revealed that the causative agent of the outbreaks of avian disease in Indonesia was avian influenza H5 subtype virus based upon serological tests, virus isolation and characterization using swine influenza reference antisera, and electron microscope examination. While subtyping of the viruses using H1 to H15 reference antisera suggested that the virus is very likely to be an avian influenza H5N1 subtype virus. The pathogenicity test confirmed that the viruses are highly pathogenic to experimental animals. It is concluded that the causative agent of the outbreaks of avian disease in Indonesia was avian influenza H5 subtype virus. The result has been the basis of further study such as development serological tests and vaccine production. The decision of Indonesian Government to conduct vaccination program using homolog vaccine in order to control the disease is regarded as the correct choice. However, it should be accompanied by conducting surveillance and monitoring of the disease as well as the possibility of mutation of virus. The program should be coordinated nationally.

Key words: Virus isolation, characterization, chicken, outbreak, highly pathogenic avian influenza (HPAI), H5 subtype, Indonesia

ABSTRAK

WIYONO, A., R. INDRIANI, N.L.P.I. DHARMAYANTI, R. DAMAYANTI, L. PAREDE, T. SYAFRIATI dan DARMINTO. 2004. Isolasi dan karakterisasi virus highly pathogenic avian influenza subtipe H5 dari ayam asal Wabah di Indonesia. *JITV* 9(1): 60-71.

Penelitian mengenai isolasi dan karakterisasi virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* dari ayam asal wabah di Indonesia telah dilaksanakan di Balai Penelitian Veteriner. Wabah penyakit unggas sangat patogenik telah terjadi di Indonesia sejak bulan Agustus 2003 menyerang ayam petelur komersial, pedaging, burung puyuh, dan burung unta serta ayam buras dengan gejala klinis antara lain kebiruan pada jengger dan pial, leleran hidung dan hipersalivasi, *ptechiae* subkutan pada kaki dan paha, diare dan kematian tinggi yang mendadak. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi agen penyebab wabah penyakit unggas. Untuk itu, dari ayam yang sedang terkena wabah penyakit unggas dikoleksi sampel berupa serum, folikel bulu, swab trakhea, dan organ berupa proventrikulus, usus, *caecal tonsil*, trakhea dan paru-paru. Sampel serum diuji *haemagglutination/haemagglutination inhibition* (HA/HI) terhadap virus *Newcastle Disease* (ND) dan *Egg Drop Syndrome* (EDS) untuk mengetahui status kesehatan pada flock tertular. Isolasi virus penyebab wabah penyakit dilaksanakan terhadap sampel folikel bulu, swab trakhea dan organ menggunakan telur *specific pathogen free* (SPF) tertunas berumur 11 hari. Virus selanjutnya dikarakterisasi dengan *agar gel precipitation test* menggunakan antisera referens *swine influenza* dan dengan uji HI menggunakan referens antisera H1 hingga H15, dan dengan pemeriksaan menggunakan mikroskop elektron. Patogenitas isolat virus diuji dengan *intravenous pathogenicity index* (IVPI) *test* dan dengan diinfeksi pada biakan sel primer *Chicken Embryo Fibroblast* tanpa penambahan tripsin. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa agen penyebab wabah penyakit unggas di Indonesia adalah virus avian influenza subtipe H5 berdasarkan uji serologi, isolasi dan karakterisasi virus menggunakan antisera referen *swine influenza* dan dengan pemeriksaan mikroskop elektron. Sedangkan berdasarkan hasil karakterisasi dengan

menggunakan antisera referen H1 hingga H15 menunjukkan bahwa kemungkinan besar subtype virus avian influenza tersebut adalah H5N1. Uji patogenitas terhadap isolat virus menunjukkan bahwa virus tersebut sangat patogen pada hewan percobaan. Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa agen penyebab wabah penyakit pada unggas di Indonesia adalah virus avian influenza subtype H5. Hasil penelitian ini merupakan dasar bagi pelaksanaan penelitian lainnya seperti penelitian pengembangan uji serologi dan pengembangan vaksin. Langkah Pemerintah Indonesia untuk melaksanakan program vaksinasi dengan menggunakan biang virus yang homolog untuk penanggulangan wabah merupakan keputusan yang tepat namun langkah tersebut harus diikuti dengan surveilen dan monitoring dinamika virus yang terprogram dan terkoordinir secara nasional.

Kata kunci: Virus, isolasi, karakterisasi, wabah, ayam, flu burung sangat patogenik (HPAI), subtype H5, Indonesia

PENDAHULUAN

Avian influenza (AI) disebut juga flu burung, fowl pest, fowl plaque atau avian flu dapat terjadi dalam 2 bentuk, yakni *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) atau *fowl plaque* dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) yang keduanya disebabkan oleh virus Influenza tipe A. Virus ini termasuk famili *Orthomyxoviridae*, yang berukuran 80-120 nm, dan berdasarkan karakter protein M nya dibedakan menjadi 3 tipe yang sangat berbeda secara antigenik yaitu virus Influenza tipe A, B, dan C. Tipe B dan C hanya ditemukan pada manusia dan kasusnya bersifat ringan. Sedang tipe A yang utama adalah menyerang unggas, walaupun juga ditemukan pada manusia, kuda, babi dan terkadang pada spesies mamalia lainnya. Berdasarkan "spike" *haemagglutinin* (HA) dan *neuraminidase* (NA) pada amplop (pembungkus luar virus) maka virus influenza ditentukan subtipenya. Virus influenza A memiliki 15 HA (H1-H15) dan 9 NA (N1-N9) yang berbeda secara antigenik. Hingga saat ini, Semua wabah penyakit HPAI yang sangat patogen pasti disebabkan subtype H5 atau H7, namun tidak sebaliknya (SWAYNE and SUAREZ, 2000)

Highly Pathogenic Avian Influenza dapat merupakan penyakit zoonosis yang berasal dari unggas yang sangat fatal dan menular mengakibatkan gejala klinis pada saluran pernapasan, gastro-intestinal dan atau syaraf. Pada tahun 1997 dunia dikejutkan oleh wabah penyakit unggas yang sangat ganas di Hong Kong yang disebabkan oleh virus influenza yang sangat patogen, H5N1, dan menular pada manusia dengan 6 kasus meninggal. Penyakit ini terdaftar sebagai penyakit list A pada *Office International des Epizooties (OIE) Manual* dan pertama kali ditemukan di Italia sekitar 1878. Semenjak tahun 1955 sudah menjadi sangat penting di seluruh dunia (OIE, 2000a).

Hampir semua unggas peka terhadap virus Influenza, baik unggas yang sudah didomestikasi misalnya ayam, kalkun, burung puyuh, itik, angsa, bebek, maupun unggas yang masih liar seperti burung kakatua. Penyakit dapat ditularkan melalui kontak langsung dengan sumber penularan, yakni sekresi hidung, mata dan feses dari unggas terinfeksi yang masuk melalui mulut, mata dan hidung. Feses yang terkontaminasi virus AI dapat tahan sampai waktu yang

sangat lama terutama dalam keadaan sejuk dan lembab (CIDRAP, 2004).

Di Indonesia, virus LPAI sudah diisolasi dari itik, burung pelikan dan bebek pada tahun 1983 dan diidentifikasi sebagai H4N6 dan H4N2 (RONOHARDJO, 1983; RONOARDJO *et al.*, 1985 dan 1986). Sejak saat itu, tidak ada lagi laporan mengenai kejadian penyakit baik LPAI maupun HPAI hingga kemudian pada pertengahan bulan September 2003, Balai Penelitian Veteriner (Balitvet) bersama dengan Balai Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Wilayah IV Wates diminta oleh Direktorat Kesehatan Hewan menangani wabah penyakit unggas yang pada waktu itu sedang terjadi di Jawa Timur. Berdasarkan laporan resmi Direktorat Kesehatan Hewan wabah ini diduga sudah terjadi sejak bulan Agustus 2003 di Jawa Tengah. Namun kejadian sebenarnya sangat sulit untuk ditelusuri kembali. Pada saat Balitvet diminta menangani wabah penyakit ini, pada bulan September 2003, penyakit ini telah menyebar dari Jawa Tengah ke Jawa Timur dan diduga juga ke Jawa Barat. Menurut DAMAYANTI *et al.* (2004a) wabah ini tidak hanya menyerang ayam petelur komersial, namun juga ayam pedaging, burung puyuh, dan burung unta serta ayam buras dengan gejala klinis antara lain kebiruan pada jengger dan pial, leleran hidung dan hipersalivasi, *ptechiae* subkutan pada kaki dan paha, diarre dan kematian tinggi yang mendadak. Melihat perkembangan penyakit, maka dikhawatirkan penyakit ini dapat segera menyebar ke pusat-pusat unggas di Indonesia sehingga mengakibatkan kerugian ekonomi yang sangat besar.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari wabah penyakit unggas dan mengisolasi, mengidentifikasi dan mengkarakterisasi virus penyebab wabah penyakit unggas tersebut.

MATERI DAN METODE

Koleksi sampel lapang

Koleksi sampel lapang dilaksanakan sesuai dengan PEARSON dan SENNE (1986) dan OIE (2000a) dengan beberapa penyesuaian.

Sampel lapang dikoleksi dari *breeding farm* dan peternakan ayam komersial di Kabupaten Malang dan Blitar, Propinsi Jawa Timur. Sampel yang dikoleksi

berupa serum darah, darah berantikoagulan, folikel bulu, swab trakhea, maupun organ yang berasal dari ayam terserang penyakit. Sampel organ antara lain proventrikulus, usus, *caecal tonsil*, trachea dan paru paru.

Sampel organ untuk isolasi disimpan pada medium transpor pada kondisi dingin yakni dengan menggunakan es selama di perjalanan dan disimpan pada -20°C pada saat sampai di laboratorium. Sedangkan folikel bulu disimpan pada medium transpor pada kondisi dingin dengan menggunakan es selama di perjalanan dan dimasukkan pada nitrogen cair pada saat sampai di laboratorium.

Pemeriksaan serologis dengan HI terhadap ND dan EDS

Sampel berupa serum yang diperoleh dari kasus lapang diperiksa titer antibodinya dengan menggunakan uji hemaglutinasi inhibisi (HI) terhadap *Newcastle Disease* (ND) (OIE, 2000b) dan terhadap *Eggs Drop Syndrome* (EDS) (MCCRACKEN and MCFERRAN, 1976).

Isolasi virus penyebab penyakit, uji Rapid dan uji HA serta uji HI terhadap Newcastle Disease

Isolasi virus AI dilaksanakan sesuai dengan OIE (2000a) dengan beberapa modifikasi, demikian juga dengan uji *Rapid* dan uji HA serta uji HI terhadap *Newcastle Disease* (OIE, 2000b). Setiap sampel organ digerus dan diencerkan 1/100 dalam PBS yang telah ditambah dengan antibiotika penisilin dan streptomisin sebanyak 100 IU (international unit) dan fungizone sebanyak 2,5 µg/ml kemudian disuntikkan pada *Alantoic Cavity* dari telur *specific pathogen free* (SPF) tertunas berumur 11 hari (produk PT. Vaksindo Satwa Nusantara) sebagai berikut

1. *Pooled* (dari 5 ekor ayam) sampel organ berupa otak dari grup A diinokulasikan ke dalam tiga butir telur
2. Sampel swab dari grup A diinokulasikan ke dalam tiga butir telur
3. *Pooled* (dari 5 ekor ayam) sampel organ berupa proventrikulus dari grup A diinokulasikan ke dalam tiga butir telur
4. *Pooled* (dari 2 ekor ayam) sampel organ berupa otak dari grup B diinokulasikan ke dalam tiga butir telur
5. Sampel swab dari grup B diinokulasikan ke dalam tiga butir telur
6. *Pooled* (dari 2 ekor ayam) sampel organ berupa otak dari grup C diinokulasikan ke dalam tiga butir telur
7. Sampel berupa folikel bulu dari grup C diinokulasikan ke dalam dua butir telur

Telur SPF yang telah diinokulasi selanjutnya diinkubasi pada 37°C dan diamati setiap hari. Setelah 40 jam telur diinkubasi, cairan alantois dipanen secara aseptis. Terhadap cairan alantois tersebut dilakukan uji *rapid* dengan menggunakan sel darah merah ayam normal 10% (SDM 10%) guna mengetahui ada tidaknya agen hemaglutinin dan dilanjutkan dengan uji hemaglutinasi (HA) untuk menentukan titernya. Apabila terdapat agen hemaglutinin, maka dilaksanakan uji hemaglutinasi inhibisi (HI) dengan menggunakan *certified reference material* (CRM) antiserum ND yang diperoleh dari ANQAP (Australian National Quality Assurance Program).

Identifikasi isolat virus terhadap AI dengan AGPT

Identifikasi isolat virus terhadap AI (Influenza A) dilaksanakan dengan menggunakan *agar gel precipitation test* (AGPT) sesuai dengan SENNE *et al.* (1986), ALEXANDER *et al.* (1986) dan OIE (2000a) dengan beberapa modifikasi.

Antigen AGPT disiapkan dengan memanfaatkan membran korioalantois (CAM) asal telur SPF terinfeksi virus isolat. Secara ringkas, membran korioalantois dicuci dengan PBS (pH 7,2), digerus dan dibuat suspensi 50%, dilakukan *freeze-thawing* sebanyak tiga kali, sebelum ditambah dengan 0,1% formalin teknis. Campuran tersebut dihomogenkan kemudian disentrifus sebelum diambil supernatannya sebagai antigen.

Antiserum Influenza A yang digunakan adalah antiserum *Swine Influenza* yang berasal dari Australian Animal Health Laboratory (AAHL), Geelong, Australia, yang merupakan salah satu laboratorium rujukan AI di dunia.

Media agar dibuat pada *petridish*, yakni 1% Agarose dalam NaCl 8% dengan pH 7.2. Pada media agar tersebut dibuat tujuh lubang yang masing masing mempunyai diameter 5 mm.

Antiserum *swine influenza* diteteskan pada bagian tengah lubang sebanyak 50µl, sedangkan isolate-isolat virus diteteskan pada lubang di sekitarnya dengan jumlah yang sama.

Identifikasi subtipe isolat virus AI dengan antisera H1-H15 referen

Salah satu isolat pada penelitian ini (yakni isolat Proventrikulus grup A), bersama-sama dengan isolat yang berasal dari BPPV Yogyakarta, Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BPMSOH) dan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gajah Mada, diuji dengan HI dengan menggunakan antisera referens (CRM) yang diperoleh Direktorat Kesehatan Hewan, Direktorat Jenderal Bina Produksi Peternakan dari CVL dan CVA (Weybridge, Inggris), yakni antisera H1N1,

H2N3, H4N6, H5N1, H6N8, H7, H8N4, H9N2, H10N9, H11N6, H12N5 dan H15N6.

Identifikasi morfologi isolat virus dengan mikroskop elektron

Empat (4) buah isolat virus pada penelitian ini (yakni isolat dari Otak grup A, Proventrikulus grup A, Swab grup B dan Swab grup A) dikirimkan ke Laboratorium Biologi Molekuler Eijkman, Universitas Indonesia dalam kondisi dingin guna pemeriksaan morfologi dengan menggunakan mikroskop elektron. Analisis terhadap hasil mikroskop elektron dilaksanakan bersama-sama antara staf laboratorium tersebut dengan peneliti Balitvet.

Penentuan patogenitas dan uji Postulat Koch isolat virus AI Subtype H5

Uji patogenitas dilaksanakan dengan menyuntikan isolat virus AI pada ayam (SENNE *et al.*, 1986; ALEXANDER *et al.*, 1986; OIE, 2000a) dan juga menginfeksi pada biakan *sel primer chicken embryo fibroblast* (CEF) (OIE, 2000a).

Masing-masing isolat virus diinfeksi pada 8 ekor ayam yang berumur 4–8 minggu melalui intravena dengan 0,2 mL cairan alantois yang diencerkan 1:10 dan bebas bakteri. Isolat yang membunuh 6 dari 8 ekor ayam diklasifikasikan sebagai *highly pathogenic avian influenza* (SENNE *et al.*, 1986; ALEXANDER *et al.*, 1986; OIE, 2000a).

Seluruh ayam yang digunakan pada uji patogenitas pada saat mati digunakan juga untuk pengujian Koch

Postulat, yakni diperiksa klinis, patologi anatomi dan histopatologi serta diisolasi kembali virusnya dari ayam tersebut.

Uji patogenitas pada biakan sel primer *chicken embryo fibroblast* (CEF) dilaksanakan dengan cara menginfeksi isolat virus pada biakan tersebut tanpa penambahan tripsin. Virus yang dapat menyebabkan timbulnya *cytopathic effect* (CPE) pada sel tersebut tanpa penambahan tripsin berarti merupakan virus patogen (OIE, 2000a).

HASIL

Pemeriksaan serologi terhadap ND dengan uji HI

Hasil pemeriksaan serologis menggunakan uji HI terhadap ND dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil uji serologis pada Tabel 1 menunjukkan bahwa serum ayam yang berasal dari kandang ayam sehat maupun yang berasal dari ayam sakit menunjukkan hasil rata-rata titer HI tinggi terhadap ND.

Pemeriksaan serologi terhadap EDS dengan uji HI

Hasil pemeriksaan serologis menggunakan uji HI terhadap EDS dapat dilihat pada Tabel 1.

Titer antibodi terhadap virus EDS menunjukkan hasil bervariasi, namun berdasarkan rata-rata titer terhadap EDS terlihat flock yang memiliki rata-rata titer EDS sangat rendah yakni flock *Breeder A* yang memiliki rata-rata titer sebesar 0,92, sedangkan yang memiliki rata-rata titer EDS rendah adalah *Breeder D* yang memiliki rata-rata titer sebesar 2,63.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan serum dengan uji HI terhadap ND dan EDS

Nama farm	Jenis ayam	Umur (minggu)	Riwayat vaksinasi	Rataan dan sebaran titer (log 2)	
				ND	EDS
Komersial HS	Layer komersial	33-48	ND, IB, IBD	7,84 (5-11)	7,83 (5-11)
Komersial D	Layer komersial	31	ND, IB, IBD	7,55 (7-9)	6,09 (5-7)
<i>Breeder A</i>	Broiler breeding	17-70	Lengkap	5,92 (4-8)	0,92 (0-2)
<i>Breeder B</i>	Layer breeding	20-70	Lengkap	8,30 (7-11)	3,70 (0-9)
<i>Breeder C</i>	Broiler breeding	20-70	Lengkap	8,13 (7-10)	4,87 (0-8)
<i>Breeder D</i>	Broiler breeding	20-70	Lengkap	7,25 (7-8)	2,63 (0-5)
<i>Breeder E</i>	Broiler breeding	20-70	Lengkap	7,50 (6-9)	4,38 (1-7)
<i>Breeder F</i>	Layer breeding	20-70	Lengkap	8,50 (8-10)	3,80 (0-7)

Lengkap: vaksinasi terhadap newcastle disease, infectious bronchitis, infectious bursal disease, mareks disease, infectious laryngotracheitis, coryza, fowl pox, egg drop syndrome

Isolasi virus

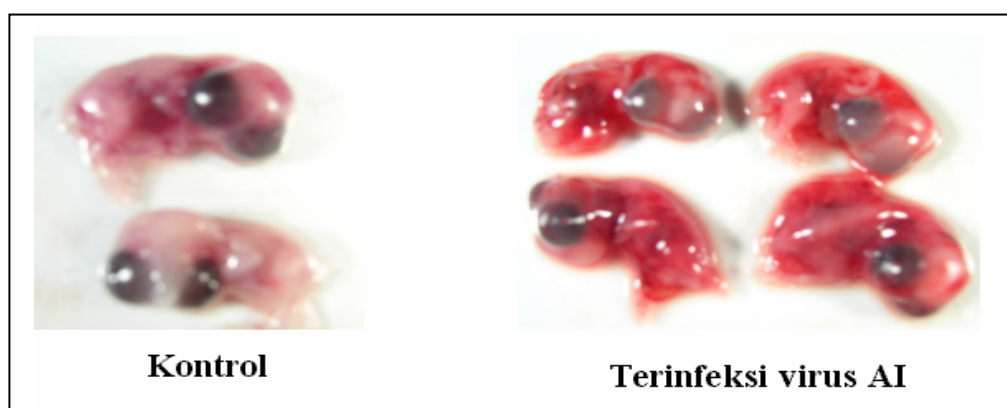
Pada organ yang diinokulasi pada telur ayam tertunas terlihat kematian telur terjadi 18-24 jam setelah inokulasi, sedangkan telur kontrol tidak mengalami kematian. Semua embrio yang mengalami kematian berwarna merah termasuk *chorio allantoic membrane* (CAM). Perubahan yang terjadi pada embrio yang diinfeksi dan embrio kontrol dapat dilihat pada Gambar 1.

Pada saat telur SPF yang terinfeksi dipanen cairan alantoisnya, dan kemudian diuji *rapid* dan HA, dari 7 (tujuh) macam sampel/inokulum, maka hanya 5 (lima) inokulum saja yang cairan alantoisnya terlihat mengaglutinasi SDM 10% pada *Rapid test*, yakni Otak grup A, Swab grup A, Proventrikulus grup A, Otak grup B dan Swab grup B (Tabel 2). Pada saat dilakukan uji

HA diketahui titernya berkisar antara 2^5 hingga 2^7 . Pada pengujian HI terhadap ND dengan menggunakan serum standar dengan titer ND sebesar 2^7 yang diperoleh dari ANQAP ternyata hanya isolat yang berasal dari Otak grup B saja yang menunjukkan virus ND, sedangkan empat isolat lainnya (Otak grup A, Swab grup A, Proventrikulus grup A, dan Swab grup B bukan merupakan virus ND (Tabel 2).

Identifikasi isolat virus terhadap AI dengan AGPT

Hasil pengujian AGP menggunakan antisera *swine influenza* dan serum ND terhadap lima isolat virus yang dapat mengaglutinasi 10% SDM dapat dilihat pada Tabel 3.



Gambar 1 Embrio yang terinfeksi virus isolat mengalami kematian berwarna merah secara keseluruhan termasuk *chorio allantoic membrane* (CAM), sedangkan embrio kontrol tetap hidup dan berwarna merah jambu

Tabel 2. Hasil isolasi virus pada telur SPF berumur 11 hari setelah 40 jam

Sampel	Jumlah inokulasi pada telur SPF (butir)	Hasil <i>Rapid Test</i>			Hasil HA	HI ND*
<i>Pooled</i> otak dari grup A	3	+	+	+	2^7	-
Swab dari grup A	3	+	+	+	2^6	-
<i>Pooled</i> proventrikulus dari grup A	3	+	+	+	2^6	-
<i>Pooled</i> otak dari grup B	3	+	+	+	2^5	2^3
Swab dari grup B	3	+	+	+	2^5	-
<i>Pooled</i> otak dari grup C	3	-	-	-		
Folikel bulu dari grup C	2	-	-	-		

- : tidak terjadi aglutinasi; + : terjadi aglutinasi; * : Semua isolat virus diadu dengan serum standar ND dengan titer sebesar 2^7 yang diperoleh dari ANQAP (Australian National Quality Assurance Program)

Tabel 3. Hasil pemeriksaan lima isolat terhadap AI dengan menggunakan antisera *swine influenza* dengan pengujian AGPT

Nama isolat	Asal	Hasil reaksi dengan	
		Serum AI	Serum ND
<i>Pooled</i> otak dari grup A	Jawa Timur	+	-
Swab dari grup A	Jawa Timur	+	-
<i>Pooled</i> proventrikulus dari grup A	Jawa Timur	+	-
<i>Pooled</i> otak dari grup B	Jawa Timur	+	+
Swab dari grup B	Jawa Timur	+	-

+ : terlihat garis presipitasi

- : tidak terlihat garis presipitasi

Pada Tabel 3 terlihat bahwa dari lima isolat yang diuji AGP, empat isolat (otak grup A, Swab grup A, Proventrikulus grup A, dan Swab grup B) hanya memperlihatkan garis presipitasi dengan antiserum *swine influenza*, sedangkan isolat Otak grup B menunjukkan garis presipitasi baik dengan serum ND maupun dengan serum AI.

Subtyping virus AI

Hasil pengujian subtyping terhadap virus AI menggunakan antiserum referensi H1 hingga H15 yang dilaksanakan di BPM SOH, Gunung Sindur, Bogor, menunjukkan bahwa isolat Proventrikulus grup A mempunyai titer yang sangat tinggi terhadap antisera H5N1, yakni 2^{11} walaupun juga menunjukkan titer rendah dengan antiserum H1N1 (2^3) dan antiserum H15N6 (2^2) sehingga disimpulkan bahwa isolat yang diuji merupakan isolat virus AI dengan subtype H5 (Tabel 4).

Tabel 4. Pengujian HI isolat Proventrikulus A dengan antiserum referensi

Nama asal isolat	Antisera referensi yang digunakan		Hasil uji HI isolate proventrikulus A (log 2)
	Asal	Subtype	
A/DK/Alberta/35/76	VLA	H1N1	2
A/Duck/Germ/1215/73	VLA	H2N3	Negatif
A/DK/Czech/56	VLA	H4N6	Negatif
A/Chicken/Scotland/59	VLA	H5N1	11
A/Ostrich/R.S.A./946/98	VLA	H6N8	Negatif
AV 1369/95/Pakistan CR2	VLA	H7	Negatif
A/Turk/Ont/6118/68	CVL	H8N4	Negatif
A/Tky/WIS/1/66	VLA	H9N2	Negatif
A/S.Africa/E9. Goose/238/98	VLA	H10N9	Negatif
A/Duck/Eng/56/AIS	-	H11N6	Negatif
A/DK/Alberta/60/76	VLA	H12N5	Negatif
A/Shearwater/WA/2576/79	CVL	H15N6	3

Patogenitas dan Koch postulat isolat virus AI pada ayam petelur

Sesuai dengan persyaratan OIE (2000a) bahwa setiap isolat virus HPAI harus dilakukan pengujian patogenitasnya. Hasil uji patogenitas dapat dilihat pada Tabel 5.

Uji patogenitas isolat virus dilaksanakan pada ayam pedaging jenis *Arbor Acres* yang berumur 32 hari. Pada Tabel 5 terlihat bahwa seluruh ayam kontrol tetap hidup kecuali satu ekor yang mengalami kematian non-spesifik. Pada ayam yang diinfeksi, kematian mulai terjadi 7 jam setelah penyuntikan dan semua mati setelah 40 jam penyuntikan. Dengan demikian, isolat yang diuji merupakan isolat yang sangat patogen (HPAI) (OIE, 2000a).

Uji patogenitas pada biakan sel primer CEF menunjukkan bahwa isolat virus menyebabkan timbulnya *cytopathic effect* (CPE) pada biakan tersebut

walaupun tanpa penambahan tripsin (Gambar 2). Hal ini berarti virus tersebut merupakan virus yang sangat patogen (OIE, 2000a).

Identifikasi morfologi isolat virus dengan mikroskop elektron

Empat buah isolat yakni Otak grup A, Swab grup A, Proventrikulus grup A, dan Swab grup B yang telah diidentifikasi sebagai virus AI subtipe H5 diperiksa

dengan mikroskop elektron di Lembaga Biologi Molekular “Eijkman”. Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa dari tiga isolat virus, yakni Otak grup A, Proventrikulus grup A, dan Swab grup B terlihat morfologi *Orthomyxovirus*, sedangkan dari satu (1) isolat Swab grup A terlihat morfologi *Orthomyxovirus* dan *Paramyxovirus* (Tabel 6). Pada Gambar 3 terlihat foto morfologi *Orthomyxovirus* isolat virus Proventrikulus grup A.

Tabel 5. Hasil uji patogenitas empat isolat virus AI subtipe H5 pada ayam pedaging jenis *Arbor Acres* yang berumur 32 hari

Lama setelah infeksi	Kontrol tanpa perlakuan			Kontrol diinfeksi dengan PBS*			Isolat otak A**			Isolat swab A**			Isolat proventrikulus A**			Isolat swab B**		
	S	L	M	S	L	M	S	L	M	S	L	M	S	L	M	S	L	M
Hari 0 (0 Jam)	10			8			8			8			8			8		
Hari 0 (7 Jam)	10			8			8			8			8			7	1	
Hari 1 (17 Jam)	10			8			8			7	1		7	1		6	1	1
Hari 1 (24 Jam)	10			8			7	1		1	1	6	3	4	1		6	1
Hari 1 (28 Jam)	10			8			6		2			1	1		6		3	3
Hari 2 (40 Jam)	10			8			4	1	1			1			1			3
Hari 3	10			7		1												

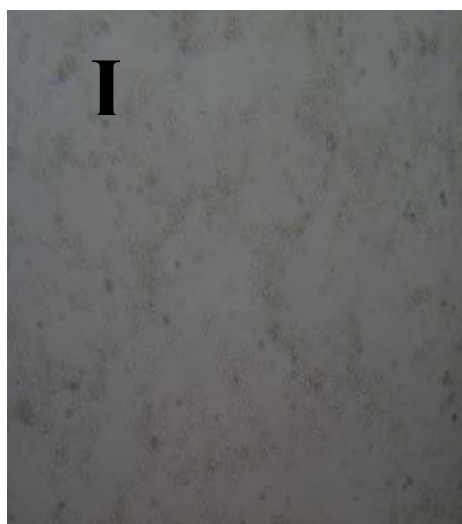
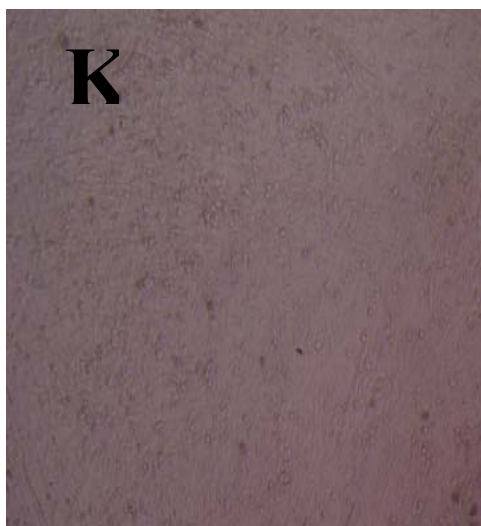
* Ayam diinfeksi intravena dengan 0,2 ml PBS steril yang merupakan media pengencer isolat

** Ayam diinfeksi intravena dengan 0,2 ml isolat virus yang sudah diuji bebas bakteri dengan enceran 1/10

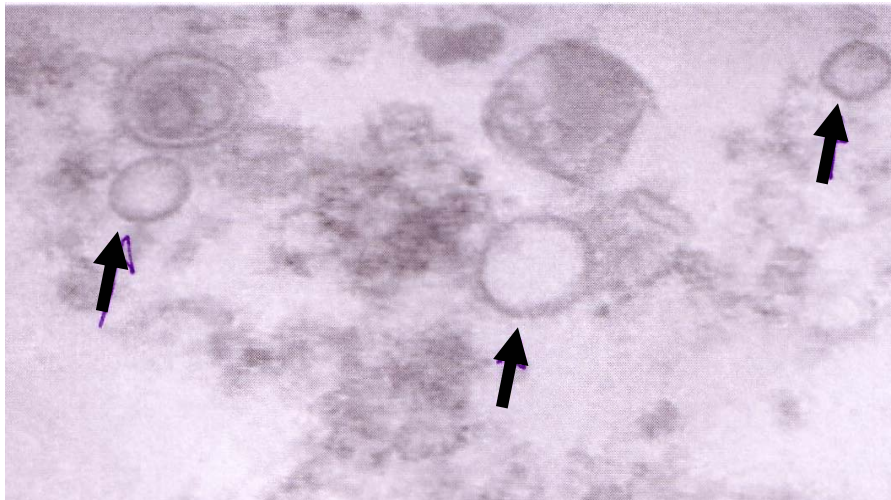
S = Sehat

L = Lesu

M = Mati



Gambar 2 Biakan sel primer *chicken embryo fibroblast* (CEF) kontrol (K), sedang yang diinfeksi dengan isolat virus (I) tanpa penambahan tripsin terlihat *cytopathic effect* (CPE)



Gambar 3. Morfologi *Orthomyxovirus* yang diperoleh dari isolat virus yang berasal dari sampel proventrikulus grup A

Tabel 6. Hasil pemeriksaan mikroskop elektron terhadap empat buah isolat di Lembaga Biologi Molekular “Eijkman”

Isolat	Morfologi yang terlihat dengan mikroskop elektron
Proventrikulus grup A	<i>Orthomyxovirus</i>
Swab grup A	<i>Orthomyxovirus</i> dan <i>Paramyxovirus</i>
Swab grup B	<i>Orthomyxovirus</i>
Otak grup A	<i>Orthomyxovirus</i>

PEMBAHASAN

Penelitian mengenai wabah penyakit pada unggas yang diduga pertama kali dilaporkan terjadi di Jawa Tengah pada bulan Agustus 2003 pada ayam *layer* telah dilaksanakan dengan mengisolasi, mengidentifikasi dan mengkarakterisasi virus penyebabnya di Balitvet. Makalah ini merupakan salah satu hasil penelitian terhadap wabah penyakit unggas tersebut. Hasil penelitian lainnya diuraikan oleh DHARMAYANTI *et al.* (2004) mengenai identifikasi isolat dengan *Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR); DAMAYANTI *et al.* (2004a) mengenai laporan klinis dan patologis; DAMAYANTI *et al.* (2004b) tentang hasil deteksi virus AI dengan menggunakan teknik immunohistokimia dan INDRIANI *et al.* (2004) tentang pengembangan uji HI terhadap virus AI dan titer proteksi terhadap virus AI isolat lapang.

Pada peternakan yang dikunjungi, berdasarkan laporan peternak ayam komersial, vaksinasi telah dilaksanakan sesuai dengan jadual rutin, sedangkan pada peternak ayam *breeder* telah dilaksanakan vaksinasi lengkap. Selain itu, dari beberapa peternak

diperoleh informasi bahwa pada saat wabah muncul beberapa flock juga divaksin ulang (re-vaksinasi) dengan vaksin hidup virus ND lentogenik, namun kebenaran informasi ini sulit ditelusuri. Hal ini tidak mengherankan, karena berdasarkan gejala klinis, morbiditas dan mortalitas penyakit, wabah ayam ini dapat dikelirukan dengan wabah akibat virus ND *vicerotropic velogenic* (VV NDV) (ALEXANDER, 1997). Selain itu, menurut EASTERDAY dan HINSHAW (1991) dan OIE (2000a), beberapa kelainan pada wabah ini dapat dikelirukan dengan penyakit lainnya seperti ILT, IB, CRD, Salmonellosis, Colibacillosis dan *Egg Drop Syndrome* (EDS). Diagnosis bandingkan penyakit ini secara lebih rinci diuraikan oleh DAMAYANTI *et al.* (2004a).

Hasil penelitian ini dilaksanakan mengacu pada OIE (2000a dan b). Pengujian serologis menggunakan uji HI dilaksanakan terhadap virus ND (OIE 2000b) dan virus EDS (MCCRACKEN and MCFERRAN, 1976) guna mengetahui status kesehatan pada flock ayam tertular. Penyakit ND diketahui merupakan penyakit yang dapat mengakibatkan kematian sangat tinggi dan virus ND merupakan virus yang mengaglutinasi sel darah merah (ALEXANDER, 1997; OIE, 2000b). Sedangkan pengujian terhadap EDS tetap dilaksanakan, walaupun penyakit EDS bukan merupakan penyakit akut yang menyebabkan kematian tinggi, namun beberapa gejala klinis, seperti produksi telur turun dan kerabang jelek pada wabah mungkin merupakan akibat infeksi virus EDS. Selain itu, virus EDS merupakan virus yang mengaglutinasi sel darah merah (MCCRACKEN and MCFERRAN, 1976; MCFERRAN *et al.*, 1977).

Hasil pemeriksaan serologis menunjukkan bahwa titer ND terlihat memiliki rata-rata yang tinggi. Besar kemungkinan hal ini menunjukkan bahwa vaksinasi pada ayam tersebut mengakibatkan kekebalan ayam yang sangat tinggi. Titer serum tinggi berarti terdapat

infeksi virus ND baik virus vaksin maupun virus akibat infeksi alami (ALEXANDER and ALLAN, 1974). Dalam hal ini apabila anamnese yang diberikan peternak benar, maka besar kemungkinan titer ND yang sangat tinggi disebabkan selain oleh vaksinasi rutin yang telah dilaksanakan juga disebabkan oleh pemberian vaksin yang berisi virus ND hidup serotipe lentogenik. Oleh karena itu, kematian akut yang masih terus terjadi pada saat wabah penyakit unggas disebabkan oleh penyakit lain selain virus ND.

Hasil pemeriksaan serologi terhadap virus EDS menunjukkan bahwa terdapat ketidakseragaman titer EDS. Hal ini menunjukkan bahwa hasil vaksinasi EDS pada flock dengan rata-rata titer EDS rendah tidak merangsang peningkatan titer EDS yang memadai (BAXENDALE, 1978; YAMAGUCHI *et al.*, 1981). Flock inilah yang sebenarnya rawan terhadap serangan penyakit akibat virus EDS. Hal serupa pernah dilaporkan di beberapa negara (MCFERRAN *et al.*, 1977; BAXENDALE, 1978; NAWATHE and ABUGUNDE, 1980; FIRTH *et al.*, 1981; YAMAGUCHI *et al.*, 1981).

Berdasarkan hasil uji HI terhadap ND dan uji AGP terhadap AI telah diperoleh empat isolat virus AI, yakni Otak grup A, Swab grup A, Proventrikulus grup A dan Swab grup B dan satu isolat campuran virus AI dan ND, yakni Otak grup B. Selanjutnya, hasil subtyping virus AI menggunakan antisera referensi H1 hingga H15 menunjukkan bahwa isolat virus AI Proventrikulus grup A mempunyai titer yang sangat tinggi dengan antiserum A/Chicken/Scotland/59 yang merupakan antiserum terhadap virus AI subtipe H5N1. Berarti berdasarkan hasil subtyping ini, isolat virus Proventrikulus grup A merupakan virus AI subtipe H5, dan besar kemungkinan merupakan virus AI subtipe H5N1 (ALEXANDER, 1986; SHORTRIDGE *et al.*, 1998; SUAREZ *et al.*, 1998; SUBBARAO *et al.*, 1998; dan TUMPEY *et al.*, 2002). Hal ini diperkuat dengan laporan DHARMAYANTI *et al.* (2004) bahwa isolat Otak grup A, Swab grup A, Proventrikulus grup A, Swab grup B dan Otak grup B tersebut merupakan isolat virus AI subtipe H5 berdasarkan uji RT-PCR. Bahkan lebih jauh lagi, hasil *alignment* pada *Gene Bank* terhadap sekuen produk RT-PCR kelima isolat tersebut menunjukkan terdapat kedekatan/homologi yang sangat tinggi (89% hingga 94%) dengan virus AI subtipe H5N1 (DHARMAYANTI, data belum dipublikasi).

Pada pemeriksaan mikroskop elektron diketahui bahwa dari keempat isolat AI subtipe H5 semua diperoleh gambaran morfologi *Orthomyxoviridae* (MURPHY and WEBSTER, 1996), kecuali satu isolat, yakni isolat Swab grup A selain diperoleh gambaran morfologi *Orthomyxoviridae* juga gambaran morfologi *Paramyxoviridae*. Hal ini berarti bahwa pada penelitian ini telah diperoleh empat isolat virus AI subtipe H5, dan dua isolat campuran virus AI dan ND. Namun demikian hasil uji patogenitas dan postulat Koch menunjukkan

bahwa dari isolat virus yang murni AI subtipe H5 mengakibatkan penyakit pada ayam percobaan dengan perubahan yang sama dengan perubahan yang terjadi di lapang dan dengan patogenitas yang sangat tinggi (ALEXANDER, 1986; OIE, 2000a). Hal ini berarti bahwa virus penyebab wabah unggas pada penelitian ini adalah virus AI subtipe H5. Sedangkan virus ND yang juga terisolasi dari lapang, besar kemungkinan merupakan virus vaksin hidup yang diberikan peternak pada saat wabah muncul (ALEXANDER, 1997) dan tidak berperan dalam kejadian wabah unggas.

Hasil penelitian ini telah mengacu pada buku petunjuk OIE (2000a dan b), dan dengan hasil menunjukkan bahwa wabah penyakit unggas bukan disebabkan oleh virus ND seperti sempat diduga pada awal wabah melainkan kasus influenza tipe A. Bahkan selanjutnya diketahui bahwa penyebab wabah penyakit ini adalah virus *highly pathogenic avian influenza* subtipe H5. Berdasarkan laporan OIE, pada saat yang bersamaan, beberapa negara di Asia antara lain Korea Selatan, Vietnam, Jepang, Thailand, dan Kambodja semua mengalami wabah serupa yang juga disebabkan oleh virus HPAI subtipe H5N1, sedangkan Taiwan terserang wabah yang disebabkan virus LPAI subtipe H5N2.

Menurut ALEXANDER (1986) sejak pertama kali avian influenza ditemukan di Italia sekitar tahun 1878, maka baru pada tahun 1959 untuk pertama kalinya PEREIRA *et al.* berhasil mengisolasi virus HPAI dari ayam, yakni subtipe H5N1 (A/chicken/Scotland/59). Setelah itu, kejadian wabah HPAI yang disebabkan oleh subtipe H5N1 yang fenomenal terjadi pada tahun 1997 yakni terjadi wabah HPAI pada unggas di Hong Kong yang disebabkan oleh virus HPAI subtipe H5N1 (SHORTRIDGE *et al.*, 1998) yang selanjutnya dikaitkan dengan penularan virus H5N1 tersebut dari unggas langsung ke manusia (SUBBARAO *et al.*, 1998). Virus avian influenza subtipe H5N1 (A/Hong Kong/156/97) berhasil diisolasi dari trakhea pada seorang anak berumur 3 tahun dengan gejala pernafasan (SUBBARAO *et al.*, 1998).

Setelah wabah unggas ditetapkan oleh Pemerintah Indonesia melalui Direktorat Jenderal Bina Produksi Peternakan sebagai wabah Penyakit AI subtipe H5, maka dalam rangka penanggulangannya telah ditetapkan kebijakan pelaksanaan program vaksinasi dengan menggunakan isolat lokal dan isolat dengan subtipe yang sama. Hal ini merupakan keputusan yang sangat tepat sebagaimana diungkapkan oleh SHANE (2000) yang menyatakan bahwa pada kejadian HPAI di Italia Utara pemotongan dan pemusnahan hewan tertular tidak dapat menyebabkan HPAI di Italia Utara mereda sebab burung-burung liar telah menjadi reservoir sehingga memungkinkan terjadi penularan kembali ke flock baru yang belum tertular. Hal seperti ini juga sangat mungkin terjadi di Indonesia mengingat

banyaknya ayam buras yang dipelihara secara ekstensif. Masih menurut SHANE (2000), apabila kebijakan pengendalian dipaksakan dilaksanakan dengan pemotongan dan pemusnahan seluruh unggas, maka akan memerlukan anggaran yang sangat besar.

Sehubungan dengan rencana Pemerintah Indonesia untuk melaksanakan program vaksinasi sebagai langkah untuk eradikasi penyakit AI, maka langkah yang harus menyertai program vaksinasi tersebut adalah pelaksanaan surveilens penyakit dan monitoring dinamika virus di lapang. Untuk itu, ada beberapa hal yang harus diperhatikan. Pertama, menurut HOFFMANN *et al.* (2000) yang membandingkan virus H5N1 asal wabah HPAI pada unggas di Hong Kong dengan tujuh subtype virus AI asal berbagai spesies burung di Hong Kong (H3N8, H4N8, H6N1, H6N9, H11N1, H11N9, dan H11N8), menunjukkan bahwa berbagai spesies burung tersebut merupakan sumber potensial untuk terjadinya virus HPAI. Oleh karena itu, HOFFMANN *et al.* (2000) selanjutnya menyarankan perlu diadakannya isolasi dan karakterisasi virus-virus asal unggas air, selain asal babi dan manusia. Kedua, menurut DONATELLI *et al.* (2001) yang berhasil mengkarakterisasi virus HPAI subtype H5N2 pada wabah di Itali Utara antara tahun 1997–1998 menyatakan bahwa virus H5N2 ini ternyata berdasarkan analisis genetik menunjukkan kemiripan dengan virus A/HK/156/97 yang merupakan virus HPAI subtype H5N1. Terlebih lagi, menurut DONATELLI *et al.* (2001) pada saat itu, selain virus HPAI H5N2 ternyata juga berhasil diisolasi dan dikarakterisasi virus LPAI H5N9 sebagai hasil dari pelaksanaan monitoring dan surveilen. Ketiga, kekhawatiran akan terjadinya penularan pada manusia (CDC, 2003) patut dikedepankan terutama apabila melihat laporan TUMPEY *et al.* (2002) yang berhasil mengkarakterisasi virus HPAI subtype H5N1 yang diisolasi dari daging bebek yang dimpor dari China ke Korea Selatan. Sejak terjadinya wabah HPAI akibat virus subtype H5N1 di Hong Kong pada unggas dan manusia pada tahun 1997, maka hasil temuan TUMPEY *et al.* (2002) ini lebih memperkuat kemungkinan terjadinya penularan dari unggas secara langsung ke manusia tanpa melalui perantara babi sebagai “mixing vessel” seperti disebutkan oleh SUAREZ *et al.* (1998). Selain itu, hasil ini juga menunjukkan bahwa virus HPAI subtype H5N1 masih terdapat di China. Keempat, yang perlu diperhatikan berkenaan dengan virus AI adalah bahwa sifat virus yang dapat dengan mudah mengalami mutasi, baik berupa *antigenic drift*, yakni perubahan secara bertahap maupun *antigenic shift* (MURPHY dan WEBSTER, 1996). Oleh karena itu, maka pelaksanaan program vaksinasi ini harus dikawal dengan pelaksanaan surveilens dan monitoring dinamika virus yang terprogram dan terkoordinir secara nasional.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa wabah penyakit unggas yang terjadi sejak bulan Agustus 2003 di Indonesia disebabkan oleh virus Avian Influenza subtype H5 dan kemungkinan besar merupakan subtype H5N1 yang sangat patogen (HPAI) pada unggas. Hasil penelitian ini merupakan dasar bagi pelaksanaan penelitian lainnya seperti penelitian pengembangan uji serologi dan pengembangan vaksin homolog. Adapun langkah Pemerintah Indonesia dalam rangka penanggulangan wabah dengan cara melaksanakan program vaksinasi dengan menggunakan biang virus yang homolog sudah merupakan keputusan yang tepat mengingat kondisi peternakan unggas di Indonesia. Namun demikian, mengingat virus AI sangat mudah bermutasi, maka disarankan agar pelaksanaan program vaksinasi AI nasional harus diikuti dengan surveilen dan monitoring dinamika virus yang terprogram dan terkoordinir secara nasional.

DAFTAR PUSTAKA

- ALEXANDER D.J. 1986. Criteria for the definition of pathogenicity of avian influenza viruses. Proc. of the Second International Symposium on Avian Influenza. Georgia, USA, September 3-5, 1986. pp. 228-245.
- ALEXANDER D.J. and W.H. ALLAN 1974. Newcastle Disease virus pathotypes. *Avian Pathol.* 3:269-278.
- ALEXANDER, D. J., G. PARSONS and R. J. MANVELL. 1986. Experimental assessment of the pathogenicity of eight avian influenza viruses of H5 subtypes for chickens, turkeys, ducks and quail. *Avian Pathol.* 15: 647–662.
- ALEXANDER, D.J. 1997. Newcastle Disease and other paramyxoviridae infections. In: Disease of Poultry. Tenth Edition. B.W. CALNEK, H.J. BARNES, C.W. BEARD, C.R. MCDAUGALD and Y.M. SAIF (Eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA hal. 541-570.
- BAXENDALE, W. 1978. Egg drop syndrome. *Vet Rec.* 102:450.
- CDC. 2003. Human cases of avian influenza A (H5N1) Infection, Hong Kong Special Administrative Region (SAR), China, 2003.
- CIDRAP (Center for Infectious Disease Research & Policy). 2004. *Highly Pathogenic Avian Influenza (Fowl Plaque)*. Academic Health Center, University of Minnesota. pp. 14.
- DAMAYANTI, R, NLP. I. DHARMAYANTI, R. INDRIANI, T. SYAFRIATI, L. PAREDE, A. WIYONO dan DARMINTO. 2004a. Gambaran klinis dan patologi ayam yang terserang flu burung sangat patogenik (HPAI) di beberapa peternakan di Jawa Timur dan Jawa Barat. *JITV (In Press)*.
- DAMAYANTI, R, NLP. I. DHARMAYANTI, R. INDRIANI, T. SYAFRIATI, L. PAREDE, A. WIYONO dan DARMINTO. 2004b. Deteksi virus avian influenza subtipo H5N1 pada

- organ ayam yang terserang flu burung sangat patogenik (HPAI) pada kasus wabah di Jawa Timur dan Jawa Barat dengan teknik imunohistokimia. *JITV (In Press)*.
- DHARMAYANTI, NLP. I, R. DAMAYANTI, A. WIYONO, L. PAREDE, R. INDRIANI, T. SYAFRIATI dan DARMINTO. 2004. Identifikasi virus avian influenza isolat lokal Indonesia dengan *Reverse Transcriptase- Polymerase Chain reaction* (RT- PCR). *JITV (In Press)*.
- DONATELLI, I., L. CAMPITELLI, L. DI TRANI, S. PUZZELLI, L. SELLI, A. FIORETTI, D.J. ALEXANDER, M. TOLLIS, S. KRAUSS and R.G. WEBSTER. 2001. Characterization of H5N2 influenza viruses from Italian poultry. *J. Gen. Virol.* 82: 623-630.
- EASTERDAY, B.C. and V.S. HINSHAW. 1991. Avian influenza. *In: Disease of Poultry 9th ed.* B.W. CALNEK, H.J. BARNES, C.W. BEARD, W.M. REID and H.W. YODER (Jr) (Eds.). Iowa State University Press, Ames. pp. 532-551.
- FIRTH GA, M.J. HALL and J.B. MCFERRAN. 1981. Isolation of haemagglutinating adeno-like virus related to virus 127 from an Australian poultry flock with an egg drop syndrome. *Aust Vet J.* 57: 239-42.
- HOFFMANN, E., J. STECH, I. LENEVA, S. KRAUSS, C. SCHOLTISSEK, P. S. CHIN, M. PEIRIS, K. F. SHORTRIDGE and R.G. WEBSTER. 2000. Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in Southern China: Was H6N1 a Derivative or a Precursor of H5N1? *J. Virol.* 74: 6309-6315.
- INDRIANI, R., NLP. I. DHARMAYANTI, A. WIYONO, DARMINTO, L. PAREDE dan T. SYAFRIATI. 2004. Respon antibodi dan titer proteksi terhadap virus highly pathogenic avian influenza subtype H5N1. *JITV (In Press)*.
- MCCRACKEN, R.M. and J.B. MCFERRAN. 1976. Experimental reproduction of the egg drop syndrome 1976 with a haemagglutinating adenovirus. *Avian Pathol.* 7: 483-490.
- MCFERRAN, J.B., H.M. ROWLEY, M.S. MCNULTY and L.J. MONTGOMERY. 1977. Serological studies on flocks showing depressed egg production. *Avian Pathol.* 6: 405-413.
- MURPHY, B.R. and R.G. WEBSTER. 1996. Orthomyxoviruses, p.1397-1445. *In: Fields Virology.* B.N. FIELDS, D.M. KNIPE and P.M. HOWLEY (Eds.). 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia Pa.
- NAWATHE D.R. and A. ABEGUNDE. 1980. Egg drop syndrome 76 in Nigeria: serological evidence in commercial farms. *Vet Rec.* 107(20): 466-7.
- OIE. 2000a. Highly Pathogenic Avian influenza Manual of Standards for Diagnostik tests and vaccines. pp 212–219.
- OIE. 2000b. Newcastle disease. *In: Manual of Standards for Diagnostik Tests and Vaccines.* pp. 221-232.
- PEARSON, J.E. and D.A. SENNE. 1986. Diagnostic procedures for avian influenza. *Proc. of The Second International Symposium on Avian Influenza.* Georgia, Usa, September 3-5, 1986. pp. 222-227.
- RONOHARDJO P. 1983. Penyakit Cengesan atau Selesma Pada Itik Tegal, Bali dan Alabio. *Penyakit Hewan XV(25)*. Semester I : 61-71.
- RONOHARDJO P., S. HARDJOSWORO, S. PARTOATMOJO and M. PARTADIREDDJA, 1985. The identification and distribution of influenza A virus in Indonesia. *Penyakit Hewan XVII (29)*, Semester I: 249-257.
- RONOHARDJO P., S. PARTOUTOMO, S. HASTIONO, N. GINTING and S. POERNOMO. 1986. The status of duck diseases in Indonesia. *Penyakit Hewan XVIII (31)*. Semester I Th 1986. : 86-93.
- SENNE, D. A., J. E. PEARSON, Y. KAWAOKA, R.A. CARBREY and R. G. WEBSTER. 1986. Alternative methods for evaluation of pathogenicity of chicken Pennsylvania H5N2 viruses. *Proc. of The Second International Symposium On Avian Influenza.* Georgia, Usa, September 3-5, 1986. pp. 246-257.
- SHANE S., 2000. Avian Influenza in Italy – A serious outbreak of the HPAI virus strain, resulted in major problems in regions of Northern Italy. *Poult. Int.* September 2000.
- SHORTRIDGE, K.F., N.N. ZHOU, Y. GUAN, P. GAO, T. ITO, Y. KAWAOKA, S. KODIHALLI, S. KRAUSS, D. MARKHILL, G. MURTI, M. NORWOOD, D. SENNE, L. SIMS, A.TAKADA and R.G. WEBSTER. 1998. Characterization of Avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hongkong. *Virolog.* 252: 331-342.
- SUAREZ, D. L., M. L. PERDUE, N. J. COX, T. ROWE, C. BENDER, J. HUANG and D. E. SWAYNE. 1998. Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Hong. *J. Virol.* 72: 6678-6688.
- SUBBARAO, K., A. KLIMOV, J. KATZ, H. REGNERY, W. LIM, H. HALL, M. PERDUE, D. SWAYNE, C. BENDER, J. HUANG, M. HEMPHILL, T. ROWE, M. SHAW, X. XU, K. FUKUDA and N. COX. 1998. Characterization of an avian influenza (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279: 393-396.
- SWAYNE, D.E. and SUAREZ DL. 2000. Highly pathogenic avian influenza. *In: Diseases of Poultry: world trade and public health implications.* BEARD CW and MCNULTY MS (Eds.). *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 19(2): 463-482.
- TUMPEY, T.M., D.L. SUAREZ, L.E.L. PERKINS, D.A. SENNE, J.G. LEE, Y.J. LEE, I.P. MO, H.W. SUNG and D.E. SWAYNE. 2002 Characterization of a Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza A Virus Isolated from Duck Meat *J. Virol.* 76: 6344-6355.
- YAMAGUCHI S., T. IMADA, H. KAWAMURA, S. TANIGUCHI, H. SAIO and K. SHIMAMATSU. 1981. Outbreaks of egg-drop syndrome-1976 in Japan and its etiological agent. *Avian Dis.* 25(3): 628-41.