

Prospek Pemanfaatan Immunoglobulin Y untuk Terapi Infeksi *Canine Parvovirus* pada Anjing

I Gusti Ayu Agung Suartini¹ dan I Sendow²

¹Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Jl. PB Sudirman, Denpasar, Bali
gaa.suartini@gmail.com

²Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114

(Diterima 30 Januari 2015 – Direvisi 9 April 2015 – Disetujui 29 April 2015)

ABSTRAK

Canine parvovirus (CPV) merupakan virus yang sangat infeksius, penyebab kematian tertinggi pada bangsa anjing di seluruh dunia. Tingkat kematian anjing akibat infeksi CPV mencapai 91%. Pencegahan infeksi CPV pada anak anjing telah dilakukan dengan cara vaksinasi dan terbukti efektif. Mekanisme protektif dari antibodi maternal berperan terhadap kegagalan vaksinasi. Karakteristik virus parvo yang sangat stabil memungkinkan virus ini tetap eksis di lingkungan. Berbagai terapi yang dilakukan hanya mampu menekan gejala klinis, namun tidak dapat mengurangi kematian anjing terutama pada anak anjing. Ulasan ini membahas alternatif terapi infeksi CPV menggunakan antibodi spesifik immunoglobulin Y (IgY) yang diisolasi dari kuning telur ayam dan keuntungan-keuntungan lainnya. Immunoglobulin Y menetralkan virus parvo sehingga tidak dapat menginfeksi sel inang. Terapi infeksi CPV menggunakan IgY secara intravena terbukti dapat menekan penyebaran virus dan mencegah kematian anjing.

Kata kunci: Virus parvo, anjing, imunoterapi, immunoglobulin Y

ABSTRACT

The Prospect of Immunoglobulin Y for Therapy of Canine Parvovirus Infection in Dogs

Canine parvovirus (CPV) is a highly infectious virus. The virus causes death in dogs worldwide. The mortality rate due to infection of CPV in dog reaches 91%. Prevention of CPV infection in puppies has been done by vaccination which is effectively proven. Protective mechanisms of maternal antibodies contribute to the failure of vaccination. Highly stable characteristics of parvovirus enable the virus still exist in the environment. Various therapies are performed only to suppress the clinical symptoms but can not reduce puppy mortalities. This review discusses CPV alternative therapy and the advantages using immunoglobulin Y (IgY) specific antibodies isolated from chicken egg yolk. Immunoglobulin Y will neutralize the virus, so it can not infect host cells. Intravenous IgY therapy has shown to suppress the spread of CPV infection and prevent death.

Key words: Parvovirus, canine, immunotherapy, immunoglobulin Y

PENDAHULUAN

Anjing merupakan salah satu hewan kesayangan yang dapat dijadikan sebagai teman, penjaga rumah, berburu, hiburan sirkus, simbol status atau komoditi komersial yang dapat diperjual belikan melalui berbagai perlombaan dan pameran anjing. Nilai jual seekor anjing dapat meningkat drastis apabila berhasil memenangkan suatu kejuaraan. Oleh karena itu, kesehatan anjing perlu dijaga dan mendapat prioritas bagi pemilik, termasuk diantaranya program pencegahan penyakit menular seperti vaksinasi terhadap rabies, distemper, parainfluenza tipe 2, *Bordetella* sp. dan *canine parvovirus* (CPV) (Singh et al. 2013). Kesadaran akan bahaya penyakit parvo ini tampak dari pemilik yang memprioritaskan anjingnya untuk divaksinasi terutama sebelum mengikuti perlombaan atau pameran.

Canine parvovirus adalah virus penyebab kematian tertinggi pada bangsa anjing, terutama menyerang anak anjing yang berumur di bawah enam bulan (Prittie 2004). Penyakit ini disebabkan oleh virus parvo. Virus parvo berasal dari bahasa latin *parvus* yang berarti kecil (Tattersall et al. 2005). Gejala penyakit yang disebabkan oleh CPV ditandai dengan muntah dan mencret berdarah dengan aroma bau yang khas. Oleh karena itu, penyakit parvo sering juga disebut penyakit muntaber pada anjing (Nwoha 2011). Anak anjing umur di bawah tiga bulan yang terinfeksi virus ini hanya bertahan 1-2 hari sebelum mati (Foster & Smith 2011; Suartini et al. 2014).

Pencegahan penyakit ini hanya dapat dilakukan dengan pemberian vaksin, meskipun kegagalan vaksinasi masih ditemukan dalam jumlah yang sedikit. Sementara upaya terapi yang diberikan masih belum efektif terutama pada anjing muda.

Tulisan ini akan membahas terapi CPV dengan menggunakan terobosan baru yang belum pernah dilakukan di Indonesia, yaitu dengan menggunakan imunoglobulin Y (IgY) yang diproduksi dari kuning telur. Selain itu, akan dibahas juga kelebihan dari terapi IgY pada anak anjing serta efektivitasnya, sehingga diharapkan dapat membuka peluang untuk dikembangkannya produksi IgY sebagai alternatif terapi CPV pada anjing di Indonesia.

SIFAT VIRUS

Virus parvo anjing berbentuk ikosahedral, dengan kisaran diameter antara 20-26 nm, materi genetik berupa DNA utas tunggal dan tidak mempunyai amplop (Nakamura et al. 2004). Panjang genom CPV adalah 5.000 nukleotida dan mempunyai reseptor khusus yang disebut *canine transferrin receptor* (Truyen 2000). Tropisme CPV adalah pada sel-sel yang sedang aktif membelah. *Canine parvovirus* memiliki tiga protein virus yaitu VP1, VP2 dan VP3 dengan berat molekul antara 82.500-63.500 Dalton. VP2 merupakan protein struktural utama yang menyusun 90% kapsid (Cavalli et al. 2008). Antigenik virus parvo memiliki kemiripan hampir 90% dengan virus panleukopenia yang merupakan virus parvo pada kucing (Truyen 2006).

Canine parvovirus adalah virus yang sangat kuat dan stabil. Infektivitas virus tidak berubah pada perlakuan pH 3,0 dan 8,0 selama empat jam (Prittie 2004). Virus stabil dan resisten terhadap berbagai desinfektan, misalnya eter dan *chloroform* (Prittie 2004). Hal ini disebabkan karena virus CPV tidak beramplop sehingga sangat tahan terhadap pelarut lemak. Virus dapat diinaktivasi dengan formalin 1%, beta-propiolakton, hidrosilamin, larutan hipoklorit 3% dan sinar ultraviolet (Nandi et al. 2010).

GEJALA KLINIS INFEKSI CANINE PARVOVIRUS

Infeksi CPV pada anjing terdiri dari dua tipe gejala klinis yaitu tipe miokarditis dan enteritis (Foster & Smith 2007). Infeksi CPV tipe miokarditis terjadi pada anak anjing umur di bawah delapan minggu yang dilahirkan dari induk yang tidak memiliki antibodi terhadap CPV (Battilani et al. 2001). Infeksi terjadi sangat akut, biasanya anak anjing mati dalam 24 jam setelah menunjukkan gejala klinis miokarditis (Latz 2002; Coney 2003). Gejala klinis infeksi CPV tipe ini yaitu sesak napas, lakrimasi dan muntah-muntah. Secara patologis, pada jantung terjadi multifokal nekrosis, lisis sel-sel otot jantung, respon inflamasi dan pada inti sel jantung ditemukan badan inklusi (*inclusion bodies*) (Prittie 2004).

Infeksi CPV tipe enteritis lebih sering ditemukan dibandingkan dengan tipe miokarditis. Infeksi lebih sering terjadi pada anak anjing berumur di atas dua bulan (Goddard & Leisewitz 2010). Gejala klinis tipe enteritis adalah depresi, hilangnya nafsu makan, muntah, demam dan diare berdarah (Deepa & Saseendrannath 2000). Anjing kehilangan banyak cairan dan protein akibat kerusakan sel epitel saluran pencernaan. Hal ini memicu terjadinya dehidrasi dan *shock hypovolemic* (Prittie 2004). Kerusakan sel epitel usus halus meningkatkan risiko translokasi bakteri ke pembuluh darah sehingga terjadi septikemia. Endotoksin yang diekskresikan oleh bakteri *Escherichia coli* akan mengaktifasi produksi sitokin. Endotoksin dan sitokin proinflamasi merupakan mediator yang potensial penyebab terjadinya respon inflamasi sistemik dan kaskade hiperkoagulasi. Diare berdarah yang terjadi pada anjing bukan merupakan akibat langsung dari infeksi virus parvo, namun akibat produksi sitokin dan endotoksemia (Primovic 2014). Septikemia dan dehidrasi merupakan penyebab utama kematian anjing yang terinfeksi CPV.

PATOGENESIS INFEKSI CANINE PARVOVIRUS

Infeksi CPV dapat terjadi secara kontak langsung melalui mulut, hidung anjing, kontak langsung antara anjing dengan feses yang mengandung virus, tanah yang tercemar virus atau benda-benda lain yang tercemar dengan virus parvo, sedangkan kontak tidak langsung dapat terjadi melalui serangga yang tercemar virus, meskipun hal ini jarang terjadi (Foster & Smith 2011). Virus yang tertelan selanjutnya menuju jaringan limfoid terutama daerah retrofaringeal, tonsil dan timus. Sebagian besar virus akan menempati *peyer's patches* (Nwoha 2011). Virus melakukan replikasi di jaringan limfoid, selanjutnya diekresikan melalui pembuluh darah sehingga terjadi viremia. Viremia terjadi selama 1-3 hari setelah infeksi, kemudian virus akan menuju limfonodus mesenterika, kripte *liberkuhn* pada usus dan sumsum tulang. Virus melakukan perlekatan dengan reseptor di sel-sel kripte usus halus dan sel-sel limfoid, untuk selanjutnya terjadi endositosis dan virus menuju inti sel serta bereplikasi (Smith & Helenius 2004).

Predileksi virus pada daerah limfoid menyebabkan deplesi limfosit dan predileksi pada usus menyebabkan nekrosis kripte dan vili-vili usus halus. Pada kondisi ini, anjing menunjukkan gejala klinis demam, muntah, tidak mau makan dan diare akibat peradangan dan tidak berfungsinya vili-vili usus halus. Infeksi CPV pada anjing adalah penyakit sistemik karena virus menyebar melalui darah dan menyerang jaringan limfoid di seluruh tubuh. Anjing akan mengalami immunosupresif akibat kerusakan jaringan limfoid. Secara klinis, anjing mengalami limfopenia dan netropenia akibat deplesi

limfoid dan berkumpulnya netrofil ke jaringan yang mengalami nekrosis (Goddard & Leisewitz 2010).

IMUNISASI *CANINE PARVOVIRUS* PADA ANAK ANJING

Infeksi CPV terutama menyerang anak anjing umur di atas enam minggu. Pada tahap awal kehidupannya, anjing memperoleh kekebalan dari induknya melalui kolostrum. Titer antibodi maternal dalam darah anak anjing tertinggi dicapai pada hari kedua hingga ketiga setelah kelahirannya. Titer antibodi tersebut akan turun dengan waktu paruh sekitar 9-10 hari. Keadaan kritis terjadi ketika titer antibodi maternal tidak lagi protektif terhadap infeksi CPV sehingga vaksinasi harus dilakukan agar kekebalan terhadap infeksi CPV dapat terjaga. Namun demikian, pemberian vaksinasi ini tidak boleh terlalu cepat, terutama saat titer antibodi maternal masih cukup tinggi dalam darah anjing. Vaksinasi yang terlalu dini kurang efisien pada anjing tersebut. Hal ini dikarenakan antibodi bawaan yang tinggi tersebut akan menetralkan virus yang ada dalam vaksin (Nandi et al. 2010). Vaksinasi CPV pada anak anjing berhasil jika titer antibodi maternal telah turun di bawah 1:10 (Schultz 2006). Data ini juga didukung oleh hasil penelitian Suartini (*unpublished*) yang menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang signifikan antara titer antibodi dengan menggunakan uji hemaglutinasi inhibisi (HI) dengan resistensi anak anjing terhadap infeksi CPV.

Truyen (2006) melaporkan bahwa 90% dari populasi anjing yang divaksin CPV memberikan respon yang baik jika vaksinasi dilakukan pada minggu ke-12, baik menggunakan vaksin multivalen maupun monovalen. Vaksin multivalen umumnya terdiri dari gabungan *canine distemper virus* (CDV), CPV, leptospirosis, hepatitis, parainfluenza tipe 2 dan virus rabies yang sudah diinaktivasi. Komposisi agen biologik yang terkandung dalam vaksin multivalen bervariasi dari satu produk dengan produk lainnya. Sedangkan vaksin monovalen biasanya mengandung virus CPV-2 dengan titer virus cukup tinggi. Jenis vaksin yang terakhir ini lebih direkomendasikan untuk vaksinasi awal, sedangkan vaksin multivalen dapat dilakukan sebagai *booster*.

Umumnya, serokonversi menggunakan vaksin monovalen terjadi lebih cepat dibandingkan dengan penggunaan vaksin multivalen. Sekitar 60% dari populasi anjing yang divaksinasi dengan vaksin CPV monovalen mengalami serokonversi setelah enam minggu divaksinasi, sedangkan anjing yang divaksinasi dengan vaksin multivalen mengalami serokonversi setelah delapan minggu vaksinasi (Pratelli et al. 2000; Truyen 2006). Hal ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Sendow & Syafriati (2006), yang

melaporkan bahwa serokonversi terjadi dua minggu setelah vaksinasi. Kegagalan vaksinasi juga terlihat pada 10% dari populasi anjing yang tidak mengalami serokonversi. Penyebab utama tidak terbentuknya respon antibodi dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya masih tingginya antibodi maternal dalam darah anjing, kondisi kesehatan anjing saat divaksinasi, mutu vaksin dan penyakit immunosupresif yang menyebabkan tidak terbentuknya kekebalan pasca-vaksinasi (Schultz 2006).

Vaksin CPV yang banyak beredar di pasaran menggunakan bibit virus CPV tipe 2 (Martella et al. 2004; Truyen 2006). Vaksin CPV-2 terbukti protektif terhadap infeksi CPV tipe 2a dan 2b (Greenwood et al. 1995). Beberapa peneliti juga melaporkan bahwa vaksin CPV tipe 2a dan 2b protektif untuk semua tipe CPV termasuk CPV-2c (Schultze 2008; Spibey et al. 2008). Saat ini, *strain* CPV yang banyak menginfeksi anak anjing di seluruh dunia adalah tipe 2a, 2b dan 2c menggantikan CPV tipe 2. Savi et al. (2009) melaporkan terjadi gastroenteritis pada anjing setelah divaksinasi CPV. Infeksi yang terjadi diduga akibat vaksin tidak memberikan proteksi penuh terhadap CPV tipe 2c. Berdasarkan hal di atas, Nandi et al. (2010) menyarankan lebih baik menggunakan vaksin yang homolog dengan virus yang prevalensinya tertinggi menginfeksi anjing di lapang.

JENIS-JENIS VAKSIN *CANINE PARVOVIRUS*

Beberapa jenis vaksin yang dapat diperoleh secara komersial saat ini diantaranya sebagai berikut:

Killed dan modified canine parvovirus

Jenis vaksin CPV yang pertama kali digunakan adalah *killed* vaksin. Vaksin ini menggunakan virus yang telah mati. Perkembangan selanjutnya menggunakan virus hidup yang telah dimodifikasi. Vaksinasi menggunakan vaksin yang mengandung virus hidup memberikan kekebalan yang lebih baik dan protektivitas lebih lama dibandingkan dengan virus mati (Schultz 2006). Namun, penggunaan vaksin hidup berdampak negatif pada anjing tersebut karena dapat menunjukkan gejala klinis. Untuk itu, dikembangkan vaksin hidup yang dimodifikasi atau yang dikenal sebagai *modified live virus* (MLV) yaitu vaksin yang menggunakan virus parvo *highly antigenic* yang telah dilemahkan (Spibey et al. 2008).

Vaksin rekombinan

Vaksin rekombinan adalah vaksin yang mengandung virus *baculo* yang mengekspresikan protein struktural (VP2), sehingga secara struktural dan

imunologik virus tersebut tidak berbeda dengan VP2 dari virion CPV. Rekombinan VP2 memiliki struktur dan ukuran virus yang sama dengan virion VP2. Konsentrasi VP2 sebanyak 10 µg dapat meningkatkan respon antibodi lebih baik dibandingkan dengan vaksin inaktif. Untuk meningkatkan respon pembentukan antibodi, vaksin rekombinan digunakan bersamaan dengan *adjuvant quil A* atau alumina sebanyak 50 µg/ekor (Nandi et al. 2010). Vaksin ini dinilai lebih aman dibandingkan dengan yang lainnya, namun harganya masih relatif mahal.

Vaksin DNA

Vaksin ini menggunakan prokariotik sebagai vektor atau pembawa gen yang menyandi protein struktural dari CPV. Anak anjing yang divaksinasi dengan vaksin DNA dapat bertahan dari CPV virulen. Hingga kini, vaksin DNA sedang dikembangkan dalam skala laboratorium dan belum dipasarkan secara luas (Gupta et al. 2005).

TERAPI INFEKSI CANINE PARVOVIRUS

Kasus infeksi CPV jika tidak ditangani dengan cepat dan tepat, dapat menyebabkan kematian anjing mencapai 91%. Sintasan hidup anjing yang terinfeksi, sangat dipengaruhi oleh kecepatan dan ketepatan diagnosis, umur anjing ketika terinfeksi dan ketepatan terapi. Terapi yang dilakukan saat ini hanyalah sebatas untuk menjaga keseimbangan cairan dan elektrolit dalam tubuh anjing (Prittie 2004), yang mengalami dehidrasi sebagai akibat kerusakan epitel saluran pencernaan dan berdampak diare dan muntah yang berlebih.

Virus parvo juga menyerang sumsum tulang dan sistem limfoid di seluruh tubuh, sehingga anjing lebih rentan terhadap infeksi sekunder. Terapi, antibiotik dilakukan untuk mencegah infeksi sekunder. Infeksi sekunder yang terjadi pada anjing berasal dari flora normal yang ada dalam usus anjing. Pada umumnya bakteri flora yang dominan dan normal ada dalam usus anjing adalah bakteri Gram negatif. Bakteri ini jika masuk ke peredaran darah akan mengeluarkan endotoksin. Endotoksin berperan penting menarik sitokin ke peredaran darah. Berbagai sitokin dalam darah akan menginduksi respon inflamasi sistemik. Sementara terapi antibiotik yang umum digunakan adalah *ampicillin*, *chloramphenicol*, *erythromycin* dan *gentamycin*. Pemberian *norfloxacin* dan *nalidixic acid* terbukti efektif untuk terapi diare berdarah pada anjing (Macintire 2008). Lebih lanjut, pemberian anti-inflamasi dapat diberikan, meskipun masih terjadi pro dan kontra.

Diare akut menyebabkan anjing mengalami metabolik asidosis, sehingga dalam cairan infus perlu ditambahkan potasium dalam bentuk KCl untuk mempertahankan keseimbangan elektrolit. Meskipun hasil yang diperoleh belum optimal, khususnya pada anjing muda, semua bentuk terapi sebaiknya dilakukan melalui parenteral. Hal ini bertujuan untuk mengistirahatkan saluran pencernaan sehingga tidak mengalami kontraksi, mengurangi diare berdarah dan menekan respon muntah. Anak anjing berumur di bawah enam bulan, sebelum dan setelah pemberian terapi tidak sepenuhnya dapat menyembuhkan sehingga kematian terjadi sangat cepat.

Selain terapi tersebut di atas, penggunaan serum hiperimun secara parenteral sangat membantu untuk menekan penyebaran virus (*viral load*) dan mencegah infeksi akut (Nandi et al. 2010). Terapi serum hiperimun yang telah dilakukan terbukti dapat menekan kematian dan mempercepat kesembuhan anjing. Keterbatasan terapi ini adalah kesulitan untuk mendapatkan hiperimun serum. Respon muntah yang terjadi pada anjing dapat diatasi dengan pemberian *chlorpromazine* atau *metaclopramide* dengan dosis 0,5 mg/kg berat badan. Anjing yang mengalami reaksi muntah terus menerus sebaiknya tidak diberi makan secara oral sampai muntah dan diare berkurang.

Dari uraian dan data tersebut di atas, maka terobosan baru yang perlu dikembangkan dan diaplikasikan untuk mengurangi angka kematian infeksi virus parvo pada anjing adalah menggunakan imunoterapi alternatif dengan IgY.

PROSPEK PEMANFAATAN ANTIBODI IMUNOGLOBULIN Y UNTUK TERAPI INFEKSI CANINE PARVOVIRUS

Imunoterapi adalah aplikasi antibodi untuk terapi penyakit infeksius pada manusia dan hewan. Pemanfaatan antibodi untuk pencegahan (imunoprofilaksis) dan terapi (imunoterapi) penyakit infeksius telah dilakukan sejak jaman dahulu. Efektivitas antibodi untuk terapi tidak tergantikan oleh bahan kimia apapun karena antibodi memiliki spesifisitas yang sangat tinggi dalam mengenali patogen dan tidak bersifat toksik (Chan et al. 2009).

Kendala utama imunoterapi adalah biaya produksi yang sangat mahal, sementara konsentrasi antibodi yang diproduksi belum konsisten dan efikasi terapi hanya bagus pada awal infeksi (Chan et al. 2009). Satu kali produksi serum memerlukan 1.000-10.000 orang untuk donor darah (Goddard & Leisewitz 2010). Antibodi hanya efektif untuk terapi antigen yang spesifik sehingga peredaran antibodi di pasaran menjadi sangat terbatas (Berghman et al. 2005).

Beberapa kendala tersebut kini dapat diatasi dengan perkembangan dan terobosan teknologi yang semakin canggih, sehingga produksi dan isolasi antibodi dapat dilakukan dengan mudah dan murah. Terapi dengan antibodi spesifik nampaknya dapat menjadi model dan metode baru yang tepat untuk penyakit infeksius (Pennington 2000).

Imunoterapi terbukti efektif untuk terapi penyakit, khususnya pada manusia yang disebabkan oleh *cytomegalovirus*, hepatitis A dan B, campak, rabies serta tetanus (Weisse 2001). Imunoterapi juga efektif menekan kematian hewan akibat toksin difteri (Buchwald & Pirofski 2003), toksin tetanus dan toksin *scarlet fever* (Weisse 2001; Buchwald & Pirofski 2003). Imunoterapi ini dilakukan dengan cara menyuntikkan antibodi secara intramuskular. Namun demikian, rute injeksi secara intramuskular sangat menyakitkan dan absorpsi antibodi belum optimal karena aktivitas proteolisis di jaringan.

Efektivitas imunoterapi secara intravena lebih baik dibandingkan dengan intramuskuler. Terapi, secara intravena dapat dilakukan dengan dosis tinggi (Shargel & Yu 2004), tidak menimbulkan rasa sakit, cepat mencapai sasaran dan tidak mengalami degradasi selama proses infus (Sujatha et al. 2011). Metode terapi ini efektif untuk penyakit yang peredarannya melalui darah. Imunoterapi yang dilakukan secara intravena memiliki kelemahan yaitu terbentuknya kompleks antigen-antibodi dan aktivasi komplemen yang dapat memicu reaksi anafilaksis dan *serum sickness* (Meenatchisundaram & Michael 2010).

Tingkat efektivitas imunoterapi sangat dipengaruhi oleh waktu, dosis terapi, kecepatan dan ketepatan menentukan mikroorganisme penyebab penyakit (serotipe). Imunoterapi akan efektif jika diaplikasikan pada awal infeksi (Pennington 2000). Terapi antibodi diawal infeksi akan menghambat replikasi virus dengan cara netralisasi, opsonisasi dan presipitasi. Selanjutnya, kompleks antibodi virus ini memicu mekanisme efektor yang berfungsi untuk mencegah penyebaran patogen. Berbeda dengan antibiotik yang membunuh patogen secara langsung atau dengan menghambat pertumbuhan patogen, antibodi memiliki kemampuan untuk membunuh patogen melalui fagositosis di tempat infeksi, kaskade komplemen, stimulasi respon inflamasi dan menarik fagosit dan stimulasi aktivitas *antibody dependent cellular immunity* untuk mencegah meluasnya infeksi dan kerusakan sel (Oral et al. 2002).

Selama beberapa dekade sejak perang dunia kedua, antibiotik merupakan pilihan utama untuk terapi penyakit infeksius namun penggunaan antibiotik yang tidak terkendali menyebabkan sebagian besar kuman menjadi resisten, sehingga terapi menjadi tidak efektif. Beberapa penyakit yang tidak responsif terhadap terapi antibiotik dan munculnya penyakit infeksius baru

menjadi tantangan bagi peneliti untuk segera menemukan zat aktif baru untuk terapi.

Sejak tahun 1980-an, potensi imunoglobulin unggas yang disebut IgY, kembali menarik perhatian peneliti karena ayam sangat berpotensi sebagai penghasil antibodi (Carlander 2002). Pemanfaatan ayam sebagai pabrik biologis penghasil antibodi mempunyai nilai penting dalam aspek kesejahteraan hewan dengan mengurangi dan mengganti penggunaan hewan coba (Dias da Silva & Tambourgi 2010). Ayam yang divaksinasi dengan antigen tertentu membentuk antibodi di dalam tubuhnya. Antibodi dalam serum ayam betina bersirkulasi dan terakumulasi dalam kuning telur. Satu ekor ayam dapat menghasilkan 17-35 gram IgY per tahun (Schade 2005). Imunoglobulin Y dari kuning telur mudah diisolasi dengan metode presipitasi sederhana, IgY murni yang disimpan pada suhu 4°C cukup stabil selama bertahun-tahun sementara biaya pemeliharaan ayam lebih murah, serta sistem imunnya cukup sensitif dan kuat (Carlander 2002). Imunoterapi IgY secara intravena merupakan pendekatan baru yang potensial untuk pengobatan penyakit yang fatal, termasuk untuk substitusi penggunaan antibiotika.

Salah satu prinsip dasar dari imunogenesitas adalah derajat keasingan antara antigen dengan hewan penerima (Tizard 2012). Jarak filogenetik ayam dengan mamalia cukup jauh (Karlsson et al. 2004) sehingga jika ayam diimunisasi dengan antigen asal mamalia dapat memicu respon antibodi yang baik.

Di sisi lain, hingga saat ini pemanfaatan IgY untuk skala industri belum banyak dilakukan karena kurangnya informasi tentang keunggulan IgY yang bersifat lebih imunogenik dibandingkan dengan IgG mamalia dan kekhawatiran bahwa telur menimbulkan reaksi alergi pada sebagian orang (Carlander 2002).

STRUKTUR DAN SIFAT IMUNOGLOBULIN YOLK

Secara fungsional IgY dan IgG adalah sama, walaupun secara struktural IgY berbeda dengan IgG (Carlander et al. 1999). Imunoglobulin Y memiliki dua rantai berat (H) dan dua rantai ringan (L) dengan berat molekul keseluruhan 180 kDa, lebih besar dibandingkan dengan IgG yaitu 159 kDa. Imunoglobulin G memiliki daerah *hinge* yang terletak antara C γ 1 dan C γ 2 sehingga lebih fleksibel dibandingkan dengan IgY (Kovacs & Mine 2004). Imunoglobulin Y tidak dapat berikatan dengan komplemen dari mamalia. Ikatan IgY dengan reseptor Fc di permukaan sel lebih lemah dibandingkan dengan IgG. Imunoglobulin Y tidak berikatan dengan protein A dari *Staphylococcus*, protein G dari *Streptococcus* dan faktor *rheumatoid* (Carlander 2002). Sifat-sifat ini menyebabkan imunoterapi IgY tidak menimbulkan

efek samping *serum sickness* dan *shock anafilaktik*, seperti yang terjadi pada serum mamalia (Dias da Silva & Tambourgi 2010). Immunoglobulin Y anti *tumor necrosis factor* (TNF) efektif digunakan untuk terapi infeksi *colitis* akut dan kronis pada tikus. Immunoglobulin Y anti TNF juga mampu menetralkan TNF pada sel manusia secara *in vitro* (Carlander 2002). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa terapi penyakit inflamasi saluran pencernaan akut pada manusia menggunakan IgY anti TNF sangat dimungkinkan. Immunoglobulin Y spesifik terhadap virus telah dilaporkan antara lain IgY spesifik terhadap *bovine rotavirus*, *bovine coronavirus* (Chalghoumi et al. 2009), virus distemper anjing (Malik et al. 2012), dan virus rabies serta mikotoksin (Sun et al. 2001).

PEMANFAATAN IMUNOGLOBULIN Y UNTUK TERAPI INFEKSI *CANINE PARVOVIRUS* PADA ANJING

Produksi IgY anti CPV dapat dilakukan dengan menyuntik induk ayam dengan antigen virus parvo. Peningkatan titer serum ayam terjadi mulai minggu pertama sampai minggu keempat setelah tiga kali imunisasi (Suartini et al. 2014). Hasil ini sesuai dengan temuan Calzado et al. (2001) bahwa titer IgY tertinggi terjadi pada minggu keempat setelah imunisasi. Antibodi yang terbentuk pada serum cukup tinggi, hal ini menunjukkan bahwa CPV bersifat imunogenik pada ayam. Titer antibodi dalam serum ayam dapat ditingkatkan dengan penggunaan *adjuvant Freund's* komplet, yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* yang sudah dilemahkan. Bakteri tersebut berfungsi sebagai imunostimulator yang memperkuat respon terbentuknya antibodi (Levesque et al. 2007).

Titer IgY anti CPV yang telah tinggi dalam serum ayam, selanjutnya ditransfer ke dalam kuning telur. Terdapat dua tahap proses pentransferan IgY dari serum induk ke kuning telur. Proses pentransferan IgY dari serum ke kantong kuning telur analog dengan sirkulasi antibodi pada mamalia melalui plasenta. Tahap kedua, transmisi IgY dari kantong kuning telur menuju kuning telur. Selanjutnya, juga dilaporkan pula bahwa titer IgY dalam serum dan kuning telur tidak berbeda secara signifikan (Carlander 2002).

Beberapa keunggulan penggunaan teknologi IgY pada kuning telur ayam diantaranya:

1. Telur dapat dimanfaatkan sebagai penghasil IgY karena biaya produksinya murah (Makvandi & Fiuzi 2002).
2. Immunoglobulin Y tidak bereaksi silang dengan komponen jaringan mamalia (faktor rheumatoid) dan sel darah merah mamalia (Carlander 2002).
3. Tidak mengaktifkan sistem komplemen sehingga terhindar dari gangguan akibat aktivasi komplemen (Szabo et al. 1998).

4. Ayam menghasilkan IgY yang lebih banyak dibandingkan dengan hewan laboratorium lainnya. Sekitar 2,5-3 gram IgY dapat diproduksi dari satu ekor ayam per bulan, 10-20 kali lebih banyak dari jumlah antibodi yang dihasilkan oleh kelinci (Carlander 2002). Pada satu butir telur terdapat 100-400 mg/ml IgY setara dengan IgG yang diperoleh dari 30 ml darah kelinci. Produksi antibodi pasif dari kuning telur ayam lebih memperhatikan kesejahteraan hewan dibandingkan dengan pengambilan darah dari hewan (Carlander 2002).
5. Koleksi telur ayam tidak menimbulkan rasa sakit dibandingkan dengan pengambilan darah pada hewan coba lainnya.
6. Ayam membutuhkan jumlah antigen lebih sedikit untuk imunisasi (Woolley & Landon 1995), sebaliknya hewan coba domba membutuhkan antigen dalam jumlah banyak untuk imunisasi agar terbentuk titer antibodi yang tinggi pada serum (Camenisch et al. 1999).

Imunoglobulin Y dalam serum ayam dapat dideteksi dengan metode hemaglutinasi inhibisi (HI). Metode ini tepat digunakan karena famili *Parvoviridae* memiliki molekul hemaglutinin pada permukaan virusnya. Keberadaan IgY anti CPV dalam serum ayam akan menghambat aktivitas hemaglutinasi dari CPV.

Spesifisitas IgY terhadap virus parvo dapat dibuktikan dengan metode *agar gel precipitation test* (AGPT) dengan terbentuknya garis presipitasi pada agar gel. Garis presipitasi terbentuk karena antigen dan antibodi yang direaksikan spesifik dengan titer yang tinggi (Roitt 2003). Karakteristik IgY dapat dibuktikan dengan deteksi berat molekul yang disandingkan dengan berat molekul protein *marker*. Hasil temuan Devi et al. (2002) membuktikan bahwa berat molekul IgY adalah 180 kDa, yang tersusun atas rantai berat dan rantai ringan, masing-masing memiliki berat molekul 68 dan 23-30 kDa. Aktivitas netralisasi IgY anti CPV telah dibuktikan dengan uji kemampuan IgY menghambat aglutinasi sel darah merah ternak babi. Selanjutnya, Suartini et al. (2014) melaporkan bahwa IgY anti CPV terbukti mampu menetralkan CPV sehingga aglutinasi eritrosit babi dapat dihambat. Hasil ini membuktikan bahwa IgY yang dihasilkan memiliki aktivitas netralisasi yang baik. Dilaporkan pula secara *in vitro*, virus parvo dapat di netralisasi oleh IgY anti CPV yang ditunjukkan dengan tidak terbentuknya efek sitopatik (CPE) pada sel FK (Suartini et al. 2014). Aktivitas netralisasi IgY menyebabkan virus parvo tidak dapat menginfeksi sel FK.

Efektivitas suatu terapi mudah diamati jika menggunakan hewan coba yang tepat dan akan menunjukkan gejala klinis jelas dan kesembuhan anjing setelah terapi. Virus parvo yang sangat patogen juga dibutuhkan untuk uji tantangan secara *in vivo* pada anjing karena perubahan gejala klinis yang jelas antara anjing

sakit dan sembuh akibat infeksi CPV akan memudahkan pengamatan efek terapi IgY.

Anjing yang terinfeksi CPV menunjukkan gejala klinis pada hari kedua setelah infeksi dengan gejala awal anjing tidak mau makan, minum dan muntah. Darah anjing yang diambil dua hari setelah infeksi menggumpal lebih cepat (hiperkoagulasi) dibandingkan dengan darah anjing dari grup negatif (Suartini et al. 2014). Berbeda dengan hasil penelitian Carman & Povey (1985) yang membuktikan bahwa anjing terinfeksi CPV menunjukkan gejala klinis enam hari setelah infeksi. Hasil temuan Otto et al. (2000) menunjukkan bahwa hiperkoagulasi terjadi karena terdapat endotoksin dan aktivasi sitokin proinflamasi yang memicu terjadinya respon inflamasi sistemik dan aktivasi kaskade koagulasi (Goddard et al. 2006). Penanda terjadinya hiperkoagulasi adalah menurunnya aktivitas antithrombin III, peningkatan konsentrasi fibrinogen, aktivasi tromboplastin dan peningkatan degradasi produk fibrin (FDP) (Otto et al. 2000).

Penelitian Ishibashi et al. (1983) mengindikasikan bahwa diare berdarah yang terjadi pada anjing tidak disebabkan langsung oleh infeksi CPV, namun akibat endotoksin dan sitokin dalam darah. Ekskresi virus di feses mulai terdeteksi pada hari kedua sampai hari keenam setelah infeksi. Hal senada juga disampaikan oleh Carmichael et al. (1980) bahwa ekskresi virus terdeteksi maksimum mulai hari keempat sampai hari ketujuh setelah infeksi.

Terapi IgY anti CPV dosis 1.000 PD₅₀ kurang efektif mencegah kematian anjing. Imunoglobulin Y anti CPV yang diinjeksikan mungkin tidak memenuhi batas protektif antibodi sehingga sebagian virus dapat bereplikasi dan mencapai organ target. Virulensi dan dosis virus yang dicekikkan pada anjing nampaknya berpengaruh pada kecepatan dan parahnya gejala klinis (Haligur et al. 2009). Tingginya laju pembelahan sel-sel limfosit dan epitel usus halus mendukung kecepatan replikasi CPV sehingga memperparah gejala klinis. Menurut Henry et al. (2001) titer antibodi terendah yang protektif mencegah infeksi CPV adalah 2⁶ HI unit. Hasil penelitian Meunier et al. (1985) mendukung hal tersebut dimana antibodi spesifik CPV dalam sirkulasi berperan menghambat penyebaran virus mencapai epitel saluran pencernaan. Adanya antibodi dalam serum dapat menekan ekskresi virus dan terjadi perbaikan gejala klinis (Ishibashi et al. 1983).

Dosis dan waktu terapi nampaknya berpengaruh juga terhadap efektivitas terapi. Imunoterapi infeksi CPV dengan antibodi spesifik paling efektif jika diaplikasikan pada awal infeksi (Hoskin 1998). Terapi yang dilakukan beberapa hari setelah infeksi memberi kesempatan virus untuk bereplikasi hingga menimbulkan gejala klinis pada anjing. Hal ini terkait dengan kasus infeksi CPV yang pada umumnya dibawa

ke rumah sakit hewan dalam kondisi sudah menunjukkan gejala klinis.

Terapi IgY anti CPV dosis 10.000 PD₅₀ terbukti efektif untuk terapi anjing yang sudah menunjukkan gejala klinis diare berdarah, sintasan hidup (*survival rate*) anjing mencapai 100% setelah terapi dan terjadi penurunan titer ekskresi virus yang signifikan. Terapi IgY anti CPV dosis 10.000 PD₅₀ secara intravena nampaknya efektif menetralkan virus yang sedang beredar di plasma, menekan replikasi dan ekskresi virus serta jumlah virus yang mencapai organ target. Antibodi yang beredar dalam darah diduga secara langsung dapat memutus rantai infeksi CPV sehingga kerusakan organ-organ limfoid terutama limfonodus mesenterika dan *peyer's patches* dapat dihambat (Suartini et al. 2014). Ishibashi et al. (1983) menyatakan bahwa anjing yang diterapi dengan serum imun (IgG) secara intravena akan sembuh dari infeksi CPV walaupun sudah menunjukkan gejala klinis diare berdarah. Keunggulan imunoterapi IgY anti CPV dibandingkan dengan imun serum yaitu anjing terhindar dari kemungkinan terkontaminasi virus parvo dan virus anjing lainnya yang terbawa di dalam serum.

KESIMPULAN

Pencegahan dan terapi infeksi virus menggunakan IgY yang berasal dari kuning telur merupakan imunoterapi yang sangat memungkinkan untuk diaplikasikan. Terapi infeksi CPV menggunakan IgY secara intravena terbukti dapat menekan penyebaran virus dan mencegah kematian anjing. Imunoglobulin Y menetralkan virus sehingga tidak dapat menginfeksi sel inang. Selain itu presipitasi virus dengan bantuan komplemen dapat mencegah terjadinya infeksi lebih luas pada berbagai organ. Terapi IgY sangat efektif jika diaplikasikan pada tahap awal terjadinya infeksi virus. Kajian tentang kinetika antibodi yang diaplikasikan secara intravena perlu dilakukan agar dosis dan interval terapi dapat ditentukan secara optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Battilani M, Scagliarini A, Tisato E, Turilli C, Jacoboni I, Casadio R, Prospero S. 2001. Analysis of canine parvovirus sequences from wolves and dogs isolated in Italy. *J Gen Virol.* 82:1555-1560.
- Berghman LR, Abi-Ghanem D, Waghela SD, Ricke SC. 2005. Antibodies: an alternative for antibiotics? *Poult Sci.* 84:660-666.
- Buchwald UK, Pirofski L. 2003. Immune therapy for infectious diseases at the dawn of the 21st century: The past, present and future role of antibody therapy, therapeutic vaccination and biological response modifiers. *Curr Pharm Des.* 9:945-968.

- Calzado EG, Garrido RMG, Schade R. 2001. Human haemoclassification by use of specific yolk antibodies obtained after immunisation of chickens against human blood group antigens. *ATLA Altern to Lab Anim.* 29:717-726.
- Camenisch G, Tini M, Chilov D, Kvietikova I, Srinivas V, Caro J, Spielmann P, Wenger RH, Gassmann M. 1999. General applicability of chicken egg yolk antibodies: The performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 α . *FASEB J.* 13:81-88.
- Carlander D. 2002. Avian IgY antibody: *In vitro* and *in vivo* [Dissertation]. Uppsala (Sweden): Acta Universitatis Upsaliensis.
- Carlander D, Stalberg J, Larsson A. 1999. Chicken antibodies. A clinical chemistry perspective. *Uppsala J Med Sci.* 104:179-190.
- Carman PS, Povey RC. 1985. Comparison of the viral protein of canine parvovirus-2, mink enteritis virus and feline panleukopenia virus. *Vet Microb.* 8:423-435.
- Carmichael LE, Joubert JC, Pollock RV. 1980. Hemagglutination by canine parvovirus: Serologic studies and diagnostic applications. *Am J Vet Res.* 41:784-791.
- Cavalli A, Martella V, Desario C, Camero M, Bellacicco AL, De Palo P, Decaro N, Elia G, Buonavoglia C. 2008. Evaluation of the antigenic relationships among canine parvovirus type 2 variants. *Clin Vaccine Immunol.* 15:534-539.
- Coney EA. 2003. Canine parvovirus infection [Internet]. [cited 8 December 2014]. Available from: <http://www.borzohealth.com/documents/parvovirusbybethConey.pdf>
- Chalghoumi R, Beckers Y, Portetelle D, Théwis A. 2009. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: A review. *Biotechnol Agron Soc Env.* 13:295-308.
- Chan CEZ, Chan AHY, Hanson BJ, Ooi EE. 2009. The use of antibodies in the treatment of infectious diseases. *Singapore Med J.* 50:663-672.
- Deepa PM, Saseendranath MR. 2000. Serological studies on canine parvoviral infection. *Indian Vet J.* 79:643-644.
- Devi CM, Vasantha BM, Vijayan LA, Umashankar PR, Krishnan LK. 2002. An improved method for isolation of anti-viper venom antibodies from chicken egg yolk. *J Biochem Biophys Methods.* 51:129-138.
- Dias da Silva W, Tambourgi D V. 2010. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol.* 135:173-180.
- Foster, Smith. 2007. Parvovirus: Serious diarrhea in puppies and dogs. *Pet Education* [Internet]. [cited 8 December 2014]. Available from: <http://www.peteducation.com/article.cfm?c=2+2102&aid=467>
- Foster, Smith. 2011. Parvovirus: Serious diarrhea in puppies & dogs. *Pet Education* [Internet]. [cited 8 December 2014]. Available from: <http://www.peteducation.com/article.cfm?c=2+2102&aid=467>
- Goddard A, Leisewitz AL. 2010. Canine parvovirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 40:1041-1053.
- Goddard A, Leisewitz AL, Christopher MM, Duncan NM, Becker PL. 2006. Prognostic usefulness of blood leukocyte changes in canine parvoviral enteritis. *J Vet Intern Med.* 22:309-316.
- Greenwood NM, Chalmers SK, Baxendale W, Thompson H. 1995. Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis and vaccine efficacy against fields. *Vet Rec.* 136:63-67.
- Gupta PK, Rai N, Raut AA, Chauhan RS. 2005. Cloning of canine parvovirus VP2 gene and its use as DNA vaccine in dogs. *Curr Sci.* 88:778-782.
- Haligur M, Ozlem O, Kenan S, Sima S. 2009. Clinical pathological and immunohistronaviral enteritis. *J Anim Vet Adv.* 8:720-725.
- Henry CJ, McCaw DL, Brock K V, Stoker AM, Tyler JW, Tate DJ, Higginbotham ML. 2001. Association between cancer chemotherapy and canine distemper virus, canine parvovirus and rabies virus antibody titers in tumor-bearing dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 219:1238-1241.
- Hoskin JD. 1998. Canine viral enteritis. In: Greene CE, editor. *Infectious disease of the dog and cat.* 2nd ed. Philadelphia (US): WB Saunders Company. p. 40-48.
- Ishibashi K, Maede Y, Ohsugi T, Onuma M, Mikami T. 1983. Serotherapy for dogs infected with canine parvovirus. *Japanese J Vet Sci.* 45:59-66.
- Karlsson M, Kollberg H, Larsson A. 2004. Chicken IgY: Utilizing the evolutionary advantage. *World Poult Sci J.* 60:341-347.
- Kovacs NJ, Mine Y. 2004. Avian egg antibodies: Basic and potential applications. *Avian Poult Biol Rev.* 15:25-46.
- Latz N. 2002. Canine parvovirus infection in free-ranging carnivores from Germany. *Heliderberg (Germany): European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (EAZWV) 4th Scientific Meeting, joint with the annual meeting of the European Wildlife Disease Association (EWDA).*
- Levesque S, Martinez G, Fairbrother M. 2007. Improvement of adjuvant system to obtain a cost-effective production of high level of specific IgY. *Poult Sci.* 86:630-635.
- Macintire D. 2008. Treatment of severe parvoviral enteritis. In: *Proceedings of the CVC Veterinary Conference Kansas City.* Kansas (US): CVC Unconventional Continuing Education.
- Makvandi M, Fiuzi R. 2002. Purification of anti-HbsAg from egg yolks of immunized hens and its application for detection of HbsAg. *Arch Iran Med.* 5:91-93.

- Malik S, Verma AK, Kumar A, Gupta MK, Sharma SD. 2012. Incidence of calf diarrhea in cattle and buffalo calves in Uttar Pradesh, India. *Asian J Anim Vet Adv.* 7:1049-1054.
- Martella V, Cavalli A, Pratelli A, Bozzo G, Camero M, Buonavoglia D, Narcisi D, Tempesta M, Buonavoglia C. 2004. A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *J Clin Microbiol.* 42:1333-1336.
- Meenatchisundaram S, Michael A. 2010. Comparison of four different purification methods for isolation of anti *Echis carinatis* antivenom antibodies from immunized chick egg yolk. *Iran J Biotechnol.* 8:50-55.
- Meunier PC, Cooper BJ, Appel MJG, Slauson DO. 1985. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: The important viraemia. *Vet Pathol.* 22:60-71.
- Nakamura M, Tohya Y, Miyazawa T, Mochizuki M, Phung HTT, Nguyen NH, Huynh LMT, Nguyen LT, Nguyen PN, Nguyen PV, et al. 2004. A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch Virol.* 149:2261-2269.
- Nandi S, Chidri S, Kumar M. 2010. Molecular characterization and nucleotide sequence analysis of canine parvovirus in vaccine in India. *Vet Ital.* 46:69-81.
- Nwoha RIO. 2011. Parvoviral enteritis in a dog: Case report and review of the literature. *Cont J Vet Sci.* 5:6-10.
- Oral HB, Ozakin C, Akdiş CA. 2002. Back to the future: Antibody-based strategies for the treatment of infectious diseases. *Mol Biotechnol.* 21:225-239.
- Otto CM, Rieser TM, Brooks MB, Russell MW. 2000. Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *J Am Vet Med Assoc.* 217:1500-1504.
- Pennington JE. 2000. Immunotherapy of infectious diseases: Past, present and future. California (US): Department of Medicine, University of California San Francisco and Cutter Laboratories, Berkeley.
- Pratelli A, Cavalli A, Normanno G, De Palma MG, Pastorelli G, Martella V, Buonavoglia C. 2000. Immunization of pups with maternally derived antibodies to canine parvovirus (CPV) using a modified-live variant (CPV-2B). *J Vet Med Ser B.* 47:273-276.
- Primovic D. 2014. Parvoviral enteritis (Parvo) in dogs. PetPlace [Internet]. [cited 19 January 2015]. Available from: <http://www.petplace.com/article/dogs/diseases-conditions-of-dogs/infection/parvoviral-enteritis-parvo-in-dogs>
- Prittie J. 2004. Canine parvoviral enteritis: A review of diagnosis, management and prevention. *J Vet Emerg Crit Care.* 14:167-176.
- Roitt IM. 2003. *Imunologi-Essential immunology*. Edisi kedelapan. Jakarta (Indonesia): Widya Medika.
- Savi J, Minakshi P, Prasad G. 2009. Genotyping of field strain of canine parvovirus in Haryana using PCR and RFLC. *Indian J Anim Sci.* 79:971-973.
- Schade R. 2005. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim.* 33:129-154.
- Schultz RD. 2006. Duration of immunity for canine and feline vaccines: A review. *Vet Microbiol.* 117:75-79.
- Schultze AE. 2008. Interpretation of canine leucocyte response. In: Schalm's Veterinary Hematol. Philadelphia (US): Lippincott Williams & Wilkins. p. 366-381.
- Sendow I, Syafriati T. 2006. Seroepidemiologi infeksi canine parvovirus pada anjing. *JITV.* 9:181-190.
- Shargel L, Yu ABC. 2004. Applied biopharmaceuticals and pharmacokinetics. 4th ed. New York (US): McGraw-Hill/Appleton & Lange.
- Singh D, Verma AK, Kumar A, Srivastava MK, Singh SK. 2013. Detection of canine parvovirus by polymerase chain reaction assay and its prevalence in dogs and around Mathura, Uttar Pradesh, India. *Am J Biochem Biotechnol.* 16:101-111.
- Smith AE, Helenius A. 2004. How viruses enter animal cells. *Sci.* 304:237-242.
- Spibey N, Greenwood NM, Sutton D, Chalmers WSK, Tarpey I. 2008. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet Microbiol.* 128:48-55.
- Suartini GAA, Suprayogi A, Wibawan WT, Sendow I, Mahardika GNK. 2014. Intravenous administration of chicken immunoglobulin has a curative effect in experimental infection of canine parvovirus. *Glob Vet.* 13:801-808.
- Sujatha, Ramesh MD, Stanley A, Schwartz MD. 2011. Therapeutic uses of intravenous immunoglobulin (IVIG) in children. *Pediatr Rev.* 16:403-409.
- Sun S, Mo W, Ji Y, Liu S. 2001. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 15:708-712.
- Szabo CS, Bardos L, Losonczy S, Karchesz K. 1998. Isolation of antibodies from chicken and quail eggs. In: 5th Internet World Congress on Biomedical Sciences [Internet]. [cited 19 January 2015]. Hamilton, 7-16th December 1998. Hamilton (Canada): Internet Association for Biomedical Sciences. Available from: <http://www.mcmaster.ca/inabis98/immunology/szabo0509/index.html>
- Tattersall P, Bergoin M, Bloom ME, Brown KE, Linden RM, Muzyczka N, Parrish CR, Tijssen P. 2005. Parvoviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. *Virus taxonomy: Classification and nomenclature*. Eighth report of the international committee on taxonomy of

- virusesxonomy. London (UK): Elsevier Academic Press. p. 353-369.
- Tizard IR. 2012. Veterinary immunology: An introduction. 9th ed. Philadelphia (US): Saunders-Elsevier.
- Truyen U. 2000. Canine parvovirus. In: Carmichael L, editor. Recent advances in canine infectious diseases. New York (US): International Veterinary Information Service.
- Truyen U. 2006. Evolution of canine parvovirus-A need for new vaccines? *Vet Microbiol.* 117:9-13.
- Weisse ME. 2001. The fourth disease, 1900-2000. *Lancet.* 357:299-301.
- Woolley JA, Landon J. 1995. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. *J Immunol Methods.* 178:253-265.