

Tingkat Proteksi Beberapa Vaksin Avian Influenza Unggas terhadap Infeksi Virus Isolat Lapang A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 pada Kondisi Laboratorium

RISA INDRIANI, N.L.P.I. DHARMAYANTI dan R.M.A. ADJID

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R.E. Martadinata No. 30, Bogor 16114

(Diterima Dewan Redaksi 28 Maret 2011)

ABSTRACT

INDRIANI, R., N.L.P.I. DHARMAYANTI and R.M.A. ADJID. 2011. Protection of avian influenza (AI) vaccines for poultry against infection of field isolates A/Chicken/West Java/Smi-Pat/2006 and A/Chicken/West Java/Smi-Mae/2008 under laboratory condition. *JITV* 16(2): 153-161.

The aim of this research was to study level of protection of avian influenza (AI) commercial vaccines available in Indonesia (subtype H5N1, H5N2 and H5N9) against infection of HPAI field isolates of A/Chicken/West Java/Smi-Pat/2006 and A/Chicken/West Java/Smi-Mae/2008. There were 7 commercial vaccines used in this study, the each vaccines were injected in to 3 weeks old of layer chichickenen intramuscularly. At 3 weeks after vaccination, ten chichickenens from each group were challenged separately with the A/Chicken/West Java/Smi-Pat/2006 and A/Chicken/West Java/Smi-Mae/2008 isolates intranasally with dose 10^6 ELD₅₀ per 0,1 ml per chicken. Ten unvaccinated chicken were included in the challenge test as control. The study demonstrate that the AI vaccines with subtype H5N1 protected chicken (100%) against virus of A/Chicken/West Java/Smi-Pat/2006 and 90-100% against virus A/Chicken/West Java/Smi-Mae/2008. Viral shedding were not seen by 2 days post challenge. The AI vaccines with subtype H5N2 protected chicken at 20-30% against virus of A/Chicken/West Java/Smi-Pat/2006 and protected chicken at 70-100% against virus of A/Chicken/West Java/Smi-Mae/2008. Viral shedding still detected at 8 days post challenge. The AI vaccines AI with subtype H5N9 did not protect chicken (0%) against virus A/Chicken/West Java/Smi-Pat/2006 and protected chicken at 50% against virus A/Chicken/West Java/Smi-Mae/2008. Viral shedding still detected by 8 days post challenge. This study concluded that AI vaccines with subtype H5N1 are better than other AI subtype vaccines in preventing HPAI virus A/Chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan A/Chicken/West Java/Smi-Mae/2008 infections under laboratory condition.

Key Words: Avian Influenza, Vaccine, Poultry, Chicken

ABSTRAK

INDRIANI, R., N.L.P.I. DHARMAYANTI dan R.M.A. ADJID. 2011. Tingkat proteksi beberapa vaksin avian influenza unggas terhadap infeksi virus isolat lapang A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 pada kondisi laboratorium. *JITV* 16(2): 153-161.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat proteksi vaksin Avian Influenza inaktif komersial (subtype H5N1, H5N2, dan H5N9) yang beredar di Indonesia terhadap infeksi virus Avian Influenza isolat lapang yang sangat ganas (HPAI) H5N1, yaitu isolat A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan A/chicken/Wes Java/Smi-Mae/2008. Tujuh vaksin AI komersial digunakan untuk penelitian ini, masing-masing vaksin disuntikan pada ayam ras petelur umur 3 minggu secara intramuskuler. Tiga minggu setelah vaksinasi, 10 ekor ayam dari masing-masing kelompok vaksinasi diinfeksi secara terpisah dengan virus Avian Influenza isolat lapang A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 secara intra nasal dengan dosis 10^6 ELD₅₀ dalam 0,1 ml per ekor. Sebanyak 10 ayam yang tidak divaksinasi diikutsertakan dalam setiap uji tantang sebagai kontrol. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa vaksin AI subtype H5N1 memberikan perlindungan 100% terhadap infeksi virus A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan 90-100% terhadap virus A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008. *Shedding virus* mulai tidak terdeteksi pada hari ke-2 setelah infeksi. Vaksin AI subtype H5N2 memberikan perlindungan 20-30% terhadap infeksi virus A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan 70-100% terhadap virus A/chicken/West Java/ Smi-Mae/2008, dan *shedding virus* masih terdeteksi pada hari ke-8 pascatang. Vaksin AI subtype H5N9 tidak memberikan perlindungan (proteksinya 0%) terhadap infeksi virus A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan 50% terhadap infeksi virus A/chicken/West Java/ Smi-Mae/2008. *Shedding virus* masih terdeteksi pada hari ke-8 setelah infeksi. Hasil penelitian di laboratorium disimpulkan bahwa vaksin AI subtype H5N1 adalah lebih baik dibandingkan dengan vaksin AI subtype H5N2 dan H5N9, mampu memberikan perlindungan lebih tinggi terhadap infeksi virus HPAI isolate A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008.

Kata Kunci: Vaksin, Avian Influenza, Unggas, Ayam

PENDAHULUAN

Kasus penyakit Avian Influenza (AI) sampai saat ini masih sering dilaporkan terjadi pada ayam komersial (DITJENNAK dan KESEHATAN HEWAN, 2011). Kejadian ini diduga kuat karena disamping penyakit AI masih endemik juga karena kebanyakan vaksin AI yang digunakan sudah tidak dapat lagi memberikan proteksi atau perlindungan yang baik terhadap infeksi virus AI sangat ganas (*Highly Pathogenic/HPAI*) yang beredar di lapang.

Pada awal tahun 2004 pemerintah Indonesia memutuskan untuk memilih strategi vaksinasi pada unggas dalam mengendalikan penyakit AI. Tujuan utama dilakukannya vaksinasi adalah untuk memberikan kekebalan pada unggas, melindungi unggas dari gejala klinis, mencegah dan menekan kematian, serta menekan pengeluaran virus (*shedding virus*) ke lingkungan. Meskipun demikian vaksinasi bukan satu-satunya cara pengendalian penyakit AI, karena harus ada cara lainnya yang menyertai sehingga pengendalian penyakit AI akan lebih efektif, yaitu biosekuriti, depopulasi terbatas, surveilans, pengawasan lalu-lintas unggas dan produknya serta bahan-bahan lainnya (KEMTAN, 2006). Rekomendasi yang dikeluarkan oleh FAO (2007) dan OIE (2007) bahwa vaksinasi terhadap HPAI dilakukan dengan menggunakan *seed* vaksin yang berasal dari *low pathogenic avian influenza* (LPAI) virus. Berdasarkan rekomendasi tersebut dan didukung oleh beberapa ahli penyakit AI maka pemerintah Indonesia mengubah kebijakan vaksinasinya, yaitu dengan menggunakan vaksin yang mengandung virus LPAI.

Pada saat ini di Indonesia telah digunakan 3 sub tipe vaksin AI, yaitu H5N1, H5N9, dan H5N2. Latar belakang digunakannya ketiga jenis vaksin itu karena vaksin H5N9 dan H5N2 dibuat dari virus AI yang kurang pathogen (LPAI) dan telah digunakan di peternakan unggas sektor 1, 2 dan 3 sejak tahun 2004, sementara vaksin H5N1 yang terbuat dari isolat lokal telah digunakan oleh pemerintah untuk pengendalian unggas di sektor 4.

Berbagai vaksin inaktif AI sub tipe H5 komersial, paling tidak 24 merek vaksin, telah digunakan untuk mencegah penyakit AI pada unggas di Indonesia. Informasi yang berkembang menyebutkan bahwa vaksin yang digunakan mampu untuk menangkal kejadian penyakit AI di peternakan ayam komersial. Sementara itu, tersebar informasi yang bertolak belakang bahwa beberapa vaksin AI, termasuk vaksin yang berbeda sub tipe, kurang efektif untuk mencegah serangan virus AI yang beredar di lapang.

Penelitian yang telah dilakukan pada tahun 2007 terhadap 11 jenis vaksin inaktif AI yang beredar di Indonesia, yaitu vaksin AI H5N1 dari dari beberapa produk yang berisikan sid vaksin A/chicken/Legok/

2003, vaksin AI H5N2 dari beberapa produk yang mengandung sid vaksin A/chicken/ Mex232/94 atau A/Turkey/England/N28/73, dan vaksin AI H5N9, memperlihatkan bahwa vaksin-vaksin yang diuji tersebut tidak memberikan tingkat proteksi yang memuaskan terhadap tantangan virus AI isolat lokal A/chicken/West Java/Pwt-Wij/2006. Tingkat proteksi tertinggi hanya mencapai 50%. Selanjutnya disebutkan bahwa isolat A/chicken/West Java/Pwt-Wij/2006 ini telah mengalami mutasi pada gen HA *cleavage site* sehingga vaksin-vaksin tadi tidak mampu memberikan proteksi yang baik terhadap virus tersebut (SWAYNE, 2007).

Hasil analisis genetik isolat-isolat virus HPAI H5N1 Indonesia pada *cleavage site* gen HA secara *phylogenetic tree* memperlihatkan bahwa beberapa virus AI isolat Indonesia masuk dalam *clade* 2.1 dengan mayoritas merupakan *subclade* 2.1.3, termasuk di dalamnya adalah isolat A/chicken/West Java/Pwt-Wij/2006. Virus AI isolat lainnya masuk ke dalam *clade* 2.1.1 dan 2.1.2 (OFFLU, 2008). DITJENNAK (2009) telah merekomendasikan isolat virus AI A/Chicken/West Java/Smi-Pat/2006 sebagai salah satu virus yang dapat digunakan sebagai virusantang dalam melakukan uji efikasi vaksin AI di Indonesia. Sementara itu, isolat A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 menyerupai isolat virus AI tahun 2003 (DHARMAYANTI *et al.*, 2009) yang masuk dalam *clade* 2.1.2 dan masih banyak ditemukan di lapang.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah beberapa produk vaksin AI komersial yang saat ini beredar di Indonesia masih mampu memberikan proteksi yang baik terhadap isolat virusantang A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008.

MATERI DAN METODE

Vaksin

Ada 7 vaksin AI komersial yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu: 1) 3 vaksin AI sub tipe H5N1 mengandung virus AI isolat Indonesia (produk A, B dan C); 2) 2 vaksin AI sub tipe H5N2 mengandung virus AI A/chicken/Mex232/94 (produk F dan D); 3) Satu vaksin AI sub tipe H5N2 mengandung virus AI A/Turkey/England/N28/73 (produk G); dan 4) Satu vaksin AI sub tipe H5N9 mengandung virus AI A/Turkey/Wisconsin /68 (produk E).

Virusantang

Virus AIantang yang digunakan adalah isolat A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008. Virus ini telah dikarakterisasi dan masuk kedalam sub tipe H5N1 yang

sangat ganas atau *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) (DHARMAYANTI *et al.*, 2007; DHARMAYANTI *et al.*, 2008).

Hewan coba dan perlakuan

Ayam *layer* (*strain Isa Brown*) umur 3 minggu digunakan dalam penelitian ini. Ayam dipelihara di kandang percobaan di laboratorium Bbalitvet. Ayam dibagi ke dalam 2 kelompok besar, yaitu kelompok ayam divaksinasi dan kelompok ayam yang tidak divaksinasi (sebagai kontrol). Untuk kelompok ayam yang divaksinasi, dibagi menjadi 7 kelompok dan masing-masing kelompok vaksinasi berisi 20 ekor ayam. Pada kelompok vaksinasi, ayam divaksin dengan dosis dan cara sesuai petunjuk yang tertera pada label produk vaksin. Setelah tiga minggu ayam divaksinasi, 10 ekor ayam dari masing-masing kelompok perlakuan (vaksinasi) yang dipilih secara acak dan 10 ekor ayam kelompok kontrol diinfeksi dengan virusantang A/chicken/West Java/ Smi-Pat/2006 di kandang isolator BSL-3 Bbalitvet. Demikian halnya 10 ekor ayam lainnya dari masing-masing kelompok vaksinasi dan 10 ekor ayam kontrol diinfeksi dengan virusantang isolat A/chicken/ West Java/Smi- Mae/2008. Dosis infeksi yang digunakan adalah 10^6 ELD₅₀ virus dalam 0,1 ml dengan cara intra nasal.

Pengamatan dilakukan setiap hari selama 14 hari. Gejala klinis, morbiditas dan mortalitas yang diakibatkan oleh infeksi virus dan waktu kematian/*mean death time* (MDT) dicatat.

Serum darah dari setiap ekor ayam dikoleksi pada saat ayam berumur 3 minggu (saat vaksinasi), pada saat ayam berumur 6 minggu (saat uji tantang), serta pada saat ayam berumur 8 minggu (saat 14 hari setelah infeksi, bila ayam masih hidup).

Serum ayam kemudian diuji dengan hemaglutinasi inhibisi (HI) untuk mengetahui titer antibodi terhadap virus AI. Ulas/swab *Oropharyngeal* dan *Cloaca* dikoleksi pada hari ke-2 dan hari ke-8 setelah infeksi/uji tantang untuk mengetahui adanya *shedding* dari virus tantang.

Uji hemaglutinasi inhibisi (HI)

Uji HI digunakan untuk mengukur kandungan antibodi terhadap virus AI dalam serum ayam coba. Pada penelitian ini setiap serum diuji terhadap 3 antigen secara terpisah, yaitu A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006, A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 dan A/Chicken/West Java/1067/2003 (standar diagnostik). Prosedur uji HI mengikuti prosedur yang diterangkan oleh OIE (2004) dan INDRIANI *et al.* (2004).

Isolasi virus

Isolasi virus dilakukan untuk mengetahui adanya *shedding* dari virus tantang pada ayam coba. Virus diisolasi pada telur ayam *specific pathogenic free* (SPF) tertunas umur 10 hari. Setiap sampel ulas/swab diinfeksi ke dalam 3 butir telur secara intra alantoik. Sebelumnya sampel ulas/swab *Oropharyngeal* maupun *Cloaca* dalam media transport DMEM yang mengandung 500 IU Penicillin-Streptomycin dan 2% *Foetal calf* serum di sentrifugasi pada kecepatan 1000 g selama 10 menit, kemudian cairan atas/supernatan diambil dan diinokulasikan sebanyak 0,1 ml ke dalam cairan alantois telur ayam tertunas *specific pathogenic free* (SPF). Telur yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi pada suhu antara 36-37°C selama 72 jam. Selanjutnya cairan alantois dari telur yang telah terinfeksi diuji terhadap aktivitas haemaglutinasi (HA), dan apabila hasilnya memberikan reaksi negatif maka dilakukan lintasan/pasase selanjutnya ke telur tertunas lainnya sampai maksimum 3 lintasan untuk menyatakan bahwa isolasi virus negatif (SWAYNE dan JACHICKENWOOD, 2006).

Analisa statistik

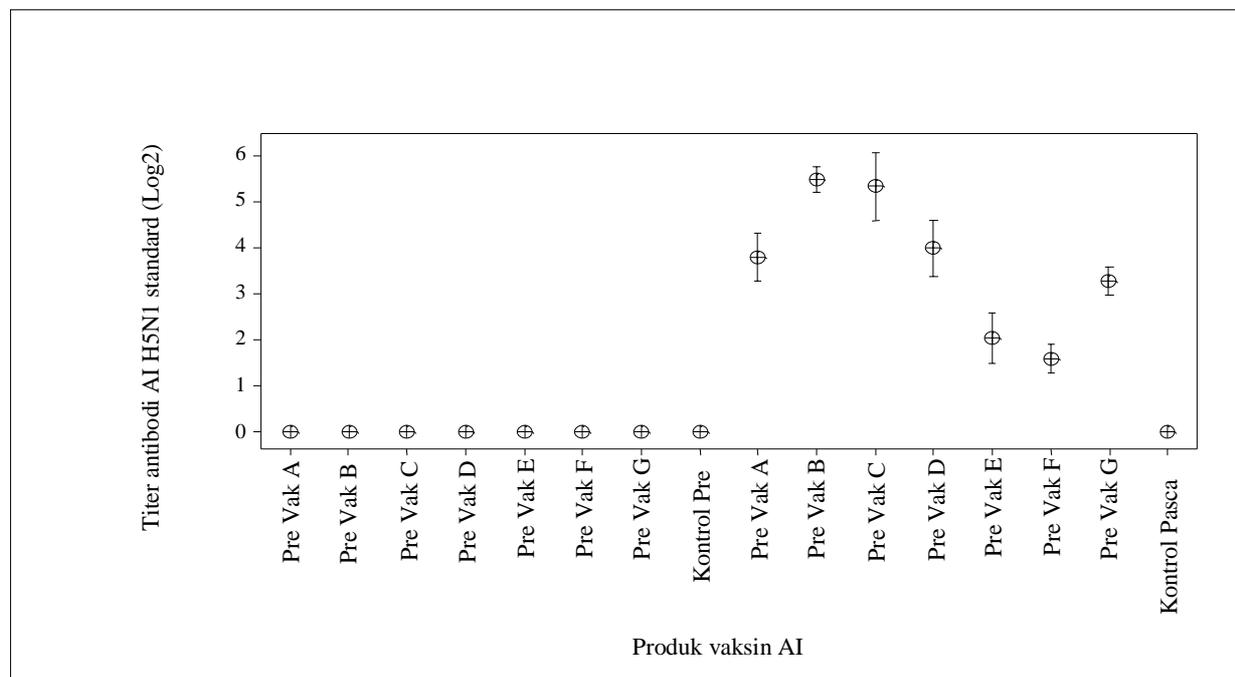
Data hasil uji serum (serologi) yang berupa kandungan antibodi (titer HI) dari sampel serum pre dan pasca vaksinasi serta pascatantang dianalisa dengan *non parametric- wilcoxon signed ranks test*. Perlindungan (morbiditas dan mortalitas) diuji statistik 2.8. Risiko relatif (RR) (*Stata 11* <http://www.stata.com/> sigma stata 2.0, stata corp 4905 like way drive, collage station Taxes USA).

HASIL

Respon antibodi setelah vaksinasi AI

Hasil pemeriksaan respon antibodi setelah vaksinasi AI pada ayam coba dengan uji HI yang ditunjukkan dengan titer antibodi, memperlihatkan bahwa pada ayam umur 3 minggu (saat divaksinasi) semua ayam coba tidak mengandung antibodi terhadap virus AI. Selanjutnya pada saat ayam berumur 6 minggu (3 minggu pascavaksinasi) semua ayam dari semua kelompok vaksinasi mengandung antibodi dengan titer yang bervariasi (Gambar 1).

Dari Gambar 1 terlihat bahwa respon antibodi pascavaksinasi yang baik adalah rata-rata titer $> 4 \log_2$, terlihat pada kelompok-kelompok ayam yang mendapat Vaksin B dan vaksin C (vaksin sub tipe H5N1) dan vaksin D(sub tipe H5N2). Sementara itu, rata-rata titer



Gambar 1. Hasil serologi uji HI AI dari ayam kelompok pravaksin dan kelompok kontrol (*significance* $P < 0,05$) terhadap kelompok pasca vaksinasi produk vaksin AI

Tabel 1. Titer antibodi (log2) dalam kelompok ayam vaksinasi (pratantang dan pascatang) dengan uji HI menggunakan antigen/virusantang

Kelompok vaksinasi	Titer antibodi (log2) dengan uji HI menggunakan antigen/virusantang (jumlah/titer)			
	A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006		A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008	
	Pratang	Pascatang	Pratang	Pascatang
Vaksin A (AI H5N1)	10 / (3,90)	10 / (6,90)	10 / (3,80)	10 / (7,30)
Vaksin B (AI H5N1)	10 / (5,15)	10 / (7,10)	10 / (5,25)	10 / (7,30)
Vaksin C (AI H5N1)	10 / (4,70)	10 / (7,10)	10 / (4,90)	10 / (9,9)
Vaksin D (AI H5N2)	10 / (3,05)	2 / (5,00)	10 / (3,10)	10 / (7,40)
Vaksin E (AI H5N9)	10 / (0,0)	TD	10 / (2,2)	5 / (5,25)
Vaksin F (AI H5N2)	10 / (0,5)	3 / (2,8)	10 / (1,4)	8 / (5,6)
Vaksin G (AI H5N2)	10 / (0,7)	2 / (3,25)	10 / (3,1)	9 / (8,1)

TD = tidak dilakukan; () = rataan titer HI; Rataan titer antibodi AI pratantang *significance* ($P < 0,05$) terhadap pascatang dengan antigen virusantang

antibodi AI yang rendah adalah titer antibodi $< 4 \log_2$, dijumpai pada kelompok ayam vaksin A (sub tipe H5N1); vaksin F dan vaksin G (sub tipe H5N2); dan vaksin E (H5N9).

Respon antibodi AI pratantang pada kelompok ayam vaksinasi terhadap kedua antigen virusantang disajikan di dalam Tabel 1. Kelompok ayam yang divaksin dengan vaksin B dan C memperlihatkan rataan

titer antibodi $> 4 \log_2$ baik terhadap antigen virus A/Chicken/West Java/Smi-Pat/2006 maupun A/Chicken/West Java/Smi-Mae/2008, sementara vaksin A memperlihatkan rataan titer antibodi $< 4 \log_2$. Kelompok ayam yang mendapat vaksinasi Vaksin D, respon titer antibodi AI terhadap kedua antigen virusantang $< 4 \log_2$ (sedikit diatas $3 \log_2$). Kelompok ayam yang mendapat vaksinasi vaksin E, F dan G

memperlihatkan rata-rata titer antibodi 0 atau mendekati 0 terhadap antigen virus A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006. Sedangkan terhadap antigen virus A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 vaksin G jauh lebih baik yaitu 3,1 log₂ sementara vaksin E dan F masing-masing adalah 2,2 log₂ dan 1,4 log₂. Respon antibodi pascatantang pada semua kelompok ayam perlakuan meningkat tajam baik terhadap virus A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 maupun A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008. Keadaan ini mengindikasikan bahwa virus AI tantang menginfeksi ayam yang telah divaksinasi.

Morbiditas, mortalitas hewan coba pascatantang

Kelompok hewan coba setelah mendapat infeksi virus tantang diamati terhadap gejala klinis, morbiditas dan mortalitasnya dengan hasil tertera pada Tabel 2 dan 3. Kelompok ayam kontrol (tidak divaksinasi) memperlihatkan gejala klinis seperti; kelesuan, duduk membungkuk, enggan atau kegagalan berdiri tegak, turunnya sayap dan kematian setelah terinfeksi virus tantang, baik virus tantang A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 (Tabel 2) maupun A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 (Tabel 3). Pada hari kedua pascatantang dari semua ayam kontrol dapat diisolasi virus tantangnya (Tabel 2 dan 3), baik dari swab *Orapharyngeal* maupun swab *cloaca*. Ayam-ayam yang divaksinasi dengan vaksin A, dan B (subtipe H5N1) tidak memperlihatkan adanya gejala klinis (morbiditas) dan kematian

(mortalitas) seperti pada kelompok ayam kontrol. Dengan demikian maka kelompok ayam tersebut mendapatkan perlindungan 100% baik terhadap infeksi virus tantang A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 maupun virus A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008.

Kelompok ayam yang divaksinasi dengan vaksin C (subtipe H5N1) tidak memperlihatkan gejala klinis atau mendapatkan perlindungan 100% dari infeksi virus A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 (Table 2), sementara perlindungan 90% dari infeksi virus A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 (Tabel 3).

Variasi signifikan antara vaksin AI dalam memberikan perlindungan (morbiditas dan mortalitas) untuk virus tantang A/chicken/West Java/Smi-Pat/ (P ± 0.000) terhadap kontrol (sigma stata 2.0, <http://www.stata.com/>)

Kelompok ayam-ayam yang divaksinasi vaksin D, F, G (subtipe H5N2) dan vaksin E (H5N9) memperlihatkan gejala klinis dengan morbiditas dan mortalitas seperti terlihat di dalam Tabel 2 terhadap serangan virus A/chicken/West Java/Smi-Part/2006. Kelompok ayam yang mendapat vaksin D, vaksin E, vaksin F dan vaksin G memperlihatkan gejala klinis dengan morbiditas dan mortalitas seperti terlihat di dalam tabel 3 terhadap serangan virus A/Chicken/West Java/Smi-Mae/2008. Dengan demikian kelompok ayam divaksinasi vaksin D, F dan G mendapatkan perlindungan 20-30% dan vaksin E (subtipe H5N9) tidak mampu memberikan proteksi (0%) dari infeksi virus A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 (Tabel 2).

Tabel 2. Data morbiditas, mortalitas dan isolasi virus dari ayam coba yang ditantang pada umur 6 minggu (3 minggu pasca-vaksinasi) dengan 10⁶ELD₅₀ HPAI A/chicken/West Java/Smi-Part/2006

Kelompok vaksinasi	Ditantang dengan A/chicken/West Java/Smi-Part/2006					
	Morbiditas sakit/Total	Mortalitas mati/total MDT (hari)	Virus isolasi (2 hari PT) positif/total swab		Virus isolasi (8 hari PT) positif/total swab	
			<i>Orapharyngeal</i>	<i>Cloaca</i>	<i>Orapharyngeal</i>	<i>Cloaca</i>
Kontrol	10/10	10/10 (1,8)	10/10	10/10	TD	TD
Vaksin A (AI H5N1)*	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Vaksin B (AI H5N1)*	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Vaksin C (AI H5N1)*	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Vaksin D (AI H5N2) ^{ns}	10/10	8/10 (2,5)	8/10	8/10	0/3	1/3
Vaksin E (AI H5N9) ^{ns}	10/10	10/10 (2,7)	10/10	10/10	TD	TD
Vaksin F (AI H5N2)#	7/10	7/10 (3,1)	8/10	7/10	1/3	1/3
Vaksin G (AI H5N2) ^{ns}	8/10	8/10 (2,5)	8/10	10/10	0/2	2/2

MDT = mean death time, TD = tidak dilakukan, PT= pascatantang, * = significant effect, ns = tidak significant, # = tidak cukup efektif

Tabel 3. Data morbiditas, mortalitas dan isolasi virus dari ayam ditantang pada umur 6 minggu (3 minggu pascavaksinasi) dengan 10⁶ ELD₅₀ HPAI A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008

Kelompok vaksinasi	Di tantang dengan A/Ck/WJ/Smi-Mae/2008					
	Morbiditas sakit/Total	Mortalitas mati/total MDT (hari)	Virus isolasi (2 hari PT) positif/total swab		Virus isolasi (8 hari PT) positif/total swab	
			<i>Oropharyngeal</i>	<i>Cloaca</i>	<i>Oropharyngeal</i>	<i>Cloaca</i>
Kontrol	10/10	10/10 (1,7)	10/10	10/10	TD	TD
Vaksin A (AI H5N1)*	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Vaksin B (AI H5N1)*	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Vaksin C (AI H5N1)*	1/10	1/10	1/10	1/10	0/9	0/9
Vaksin D (AI H5N2) ^{ns}	8/10	0/10	5/10	3/10	0/10	0/10
Vaksin E (AI H5N9)*	5/10	5/10	5/10	6/10	4/5	4/5
Vaksin F (AI H5N2)#	3/10	2/10	4/10	5/10	1/8	2/8
Vaksin G (AI H5N2)*	2/10	1/10	3/10	1/10	1/9	2/9

MDT = *mean death time*; TD = tidak dilakukan; PT = pascatantang; * = *significant effect*; ^{ns} = tidak *significant*; # = tidak cukup efektif
 Variasi signifikan antara vaksin AI dalam memberikan perlindungan morbiditas dan mortalitas untuk virusantang A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 (P ± 0.000) terhadap kontrol (sigma stata 2.0, <http://www.stata.com/>)

Kelompok ayam divaksinasi vaksin D mendapatkan perlindungan 100% dari infeksi virus A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 (Tabel 3), sementara vaksin G memberikan proteksi 90%, vaksin F memberikan proteksi 80% dan vaksin E memberikan proteksi 50% terhadap infeksi virus A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 (Tabel 3).

Analisa efisiensi vaksin AI terhadap kedua virus tantang (A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008), memperlihatkan bahwa semua vaksin AI mempunyai manfaat (efisiensi) terhadap kontrol (*significant* P < 0,05) dalam memberikan perlindungan dari klinis dan kematian ayam coba, kecuali produk vaksin D (P = 0,1468). Walaupun vaksin E mempunyai manfaat (efisiensi) 25% (P = 0,0168) terhadap kontrol, namun tidak memberikan cukup perlindungan. Pengaruh virus tantang, memperlihatkan bahwa hanya vaksin G mempunyai pengaruh yang efektif terhadap virus A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 namun tidak terhadap virus A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006. Walaupun vaksin F tidak cukup efektif (p= 0,053), tetapi vaksin tersebut bisa mempunyai pengaruh apabila populasi ayam yang divaksinasi lebih banyak

Kelompok ayam kontrol yang terinfeksi virus tantang, baik virus A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008, mempunyai rata-rata waktu kematian (MDT) masing-masing 1,8 dan 1,7 (Tabel 2 dan 3), dan memperlihatkan adanya *shedding virus* baik dari *oropharyngeal* dan *cloaca*. Pada hari kedua pascatantang, ayam yang divaksinasi

dengan vaksin A, B dan C tidak memperlihatkan adanya *shedding virus* tantang A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 (Tabel 2.), namun pada ayam-ayam yang divaksinasi dengan vaksin D, terlihat adanya *shedding virus* virus tantang A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 (Tabel 2) dan virus A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 (Tabel 3). Ayam yang di vaksinasi dengan vaksin F memperlihatkan *shedding virus* tantang A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 (Tabel 2) dan virus tantang A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 (Tabel 3). Ayam-ayam yang divaksinasi dengan vaksin G memperlihatkan *shedding virus* tantang A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 (Tabel 2), sementara *shedding virus* tantang A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 di dalam Tabel 3.

Pada hari kedelapan pascatantang, ayam-ayam yang divaksinasi dengan vaksin A, B, dan C, tidak lagi memperlihatkan adanya *shedding virus* tantang (Tabel 2 dan Tabel 3). Ayam divaksinasi dengan vaksin D (ayam yang masih hidup) masih memperlihatkan *shedding virus* tantang A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 (Tabel 2), namun tidak lagi memperlihatkan *shedding virus* tantang A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 (Tabel 3). Pada ayam divaksinasi dengan vaksin E, memperlihatkan *shedding virus* A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 (Tabel 3). Ayam divaksinasi dengan vaksin F dan vaksin G (ayam yang masih hidup) masih memperlihatkan adanya *shedding virus* tantang A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 (Tabel 2) dan *shedding virus* tantang A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 (Tabel 3).

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini memperlihatkan respon vaksin dari berbagai vaksin komersial dari ketiga subtipe H5N1, H5N2 dan H5N9, yang ditunjukkan oleh titer antibodi terhadap virus AI pada saat ayam berumur 6 minggu (3 minggu pascavaksinasi), bervariasi.

Variasi ini bisa disebabkan antara lain oleh kualitas vaksin (kandungan massa antigen, jenis ajuvan, serta homogenitas), serta komabilitas antigen vaksin dengan antigen yang digunakan dalam uji HI. Terlepas dari kualitas vaksin, dimana dalam penelitian ini tidak dilakukan uji mutu, maka yang jelas berbeda adalah antigen yang digunakan dalam uji HI. Tiga jenis antigen yang digunakan uji HI dalam penelitian ini, yaitu A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 dan A/chicken/West Java/1067/2003 merupakan antigen/virus H5N1.

Perbedaan dua virus yang digunakan sebagai antigen uji HI yang sekaligus sebagai virusantang AI, A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 dan A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006, adalah A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 merupakan virus yang masih serupa/mirip dengan virus AI penyebab awal *outbreak* pada tahun 2003 dan belum mengalami *antigenic drift* (DHARMAYANTI *et al.*, 2009). Sementara itu, virus A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 merupakan virus yang sudah mengalami mutasi *antigenic drift* (DHARMAYANTI dan DARMINTO, 2008) dan virus A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 mempunyai mutasi yang khas yang juga dimiliki oleh virus-virus *antigenic drift* yang telah ditemukan oleh DHARMAYANTI (2009) yaitu mempunyai 18-19 substitusi asam amino pada level protein HA dibandingkan dengan virus AI tahun 2003.

Respon antibodi pascavaksinasi oleh vaksin dengan subtipe H5N1 memperlihatkan respon yang lebih tinggi dibandingkan dengan respon vaksinasi oleh vaksin dengan subtipe H5N2 maupun H5N9. Hal ini dapat dipahami karena antigen yang digunakan dalam uji HI adalah virus AI dengan subtipe H5N1 atau homolog dengan vaksin subtipe H5N1 yang diteliti meskipun tingkat homologinya mungkin tidak 100%. Sebaliknya antigen tersebut heterolog dengan vaksin subtipe H5N2 dan H5N9 yang diteliti, sehingga respon pasca vaksinasi, yang dinyatakan dengan titer antibodi, nilainya sangat rendah bahkan ada yang tidak terdeteksi.

Sementara itu, pada vaksin yang memiliki subtipe yang sama, dalam hal ini vaksin A, B dan C, juga dapat terjadi perbedaan respon pasca vaksinasi. Hal ini telah diterangkan oleh SWAYNE *et al.* (1997) yang menyatakan adanya perbedaan respon titer antibodi pasca vaksinasi dari produk vaksin yang sama subtipe bisa disebabkan dari massa antigen yang terkandung di

dalam suatu produk vaksin dan formulasi vaksin itu sendiri.

Berdasarkan titer antibodi dapat diprediksi tingkat proteksinya pada saat terjadi infeksi. Hal ini terjadi pada penelitian ini dimana kelompok ayam coba yang divaksinasi dengan vaksin subtipe H5N1 memiliki titer antibodi yang lebih tinggi serta tingkat proteksi yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok ayam yang divaksin dengan vaksin subtipe H5N2 maupun H5N9. Menurut OIE (2004) dan DITJENNAK (2004) untuk penyakit AI titer antibodi protektif adalah $\geq 4 \log_2$.

Proteksi beberapa vaksin AI H5N1 yang digunakan pada penelitian ini mempunyai tingkat proteksi yang sangat baik yaitu 90-100% terhadap kedua virusantang, sedangkan hasil penelitian SWAYNE (2007) yaitu $\leq 50\%$, hal ini dikarenakan seed vaksin AI H5N1 yang terkandung dalam produk-produk vaksin tersebut sudah menggunakan seed vaksin baru diantaranya A/chicken/West Java/Pwt-Wij/2008, A/chicken/Pekalongan/BBVW-208/2007, A/chicken/Garut/BBVW-233/2007, A/chicken/West Java(Nagrak)/30/2007 (DITJENNAK, 2009) sedangkan pada penelitian SWAYNE (2007) mengandung seed vaksin AI A/chicken/West Java/Legok/2003. SWAYNE (2007) dalam penelitiannya juga memperlihatkan vaksin AI yang mengandung subtipe H5N2 (A/chicken/Mex232/94 dan A/Turkey/England/N28/73) hanya memberikan proteksi $\leq 40\%$ terhadap virusantang AI varian A/chicken/West Java/Pwt-Wij/2008, sedangkan vaksin AI subtipe H5N9 (A/Turkey/Wisconsin/680) tidak mampu memberikan perlindungan. Keadaan ini serupa dan memperkuat hasil studi ini terhadap virusantang AI varian A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006.

Pada kondisi di lapang, penggunaan vaksin heterolog akan memberikan rasa aman bagi para peternak jika titer antibodi pascavaksinasi mencapai titer yang tinggi ($> 7 \log_2$). Jika titer antibodi lebih rendah dari angka tersebut, maka akan sering terjadi kematian akibat infeksi AI atau penurunan produksi telur yang tajam (sampai 40%) yang diduga akibat infeksi AI subklinis (MAHARDIKA, 2009).

Pada penelitian ini kelompok ayam yang mendapat vaksinasi AI subtipe H5N1 ketika terinfeksi dengan virusantang HPAI A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 mendapatkan perlindungan 100%, sementara kelompok ayam yang divaksinasi dengan vaksin AI H5N2 hanya mendapat perlindungan 20-30%, demikian pula kelompok ayam yang mendapat vaksinasi AI H5N9 tidak mendapatkan perlindungan (0%). Sementara itu, terhadap virusantang A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008, tingkat proteksi vaksin subtipe H5N1 adalah 90-100%, tingkat proteksi vaksin subtipe H5N2 adalah 80% hingga 100%, sedangkan vaksin subtipe H5N9 tingkat proteksinya adalah 50%. Dari data ini terlihat bahwa vaksin yang homolog subtipenya dengan virusantang memiliki tingkat proteksi yang lebih tinggi.

Dari segi *shedding virus*, hanya vaksin subtipe H5N1 (Vaksin A, B, dan C) yang tidak memperlihatkan *shedding virus*antang baik A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008 maupun A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 pada hari kedelapan pascatantang, sementara vaksin subtipe lainnya (H5N2 dan H5N9) memperlihatkan *shedding virus*antang pada hari ke-8 pascatantang. Farmakope Obat Hewan Indonesia menetapkan bahwa, vaksin AI yang dikatakan baik dan memenuhi syarat adalah vaksin yang mampu melindungi sekurangnya 90% ayam coba serta mampu mengurangi dan memberhentikan *shedding virus*antang pada hari ke-8 pascatantang (DITJENNAK, 2007). Dengan demikian hanya vaksin subtipe H5N1 yang dianggap baik dalam penelitian ini.

POETRY *et al.* (2009) dalam studi efikasi vaksin heterologus H5N2 pada ayam buras memperlihatkan vaksin tersebut mampu mencegah transmisi virus AI Legok (2003) di dalam flock ayam buras. Perbedaan ini mungkin dalam infeksi virusantang A/Chicken/WEST JAVA/ Smi-Mae/2008 yang dilakukan dalam penelitian ini virusnya dilakukan secara terukur dan diberikan melalui dropping langsung ke dalam intranasal, sementara infeksi virusantang AI Legok dilakukan melalui transmisi dari ayam yang telah diinfeksi terlebih dahulu.

MAHARDIKA *et al.* (2009) membandingkan jarak genetik (%) pada tingkat asam nukleat dan asam amino seluruh protein hemaglutin dari virus AI subtipe H5N2, H5N9 dan H5N1-Indonesia. Hasilnya memperlihatkan bahwa pada tingkat asam nukleat jarak genetik gen HA antara H5N1 Indonesia dengan H5N2 dan H5N9 adalah 16,2 dan 9,6% secara berurutan. Sementara pada tingkat asam amino jaraknya adalah 9,7 dan 6,8%. Jarak genetik fragmen HA1 antara H5N1-Indonesia pada H5N2 dan H5N9 adalah 19,0 dan 10,9%, sementara pada tingkat asam amino adalah 13,1 dan 8,8% secara berturut-turut.

Perbedaan jarak genetik ini memperlihatkan homologi virus di dalam vaksin antara subtipe. Vaksin yang hendak digunakan sebaiknya mempunyai homologi genetik dan antigenik yang mendekati sempurna dengan virus yang beredar di lapang.

INDRIANI *et al.* (2005) telah menguji suatu prototipe vaksin inaktif AI H5N1 dari isolat lokal tahun 2003. Pada ayam layer umur 4 minggu. Uji tantang yang dilakukan pada 3 minggu pascavaksinasi menggunakan virus homolog memperlihatkan tingkat perlindungan 100%.

CHEN *et al.* (2006) juga menerangkan bahwa penggunaan vaksin heterolog dengan H5 secara logis tidak sesuai, walaupun reaksi silang juga terjadi. MAHARDIKA *et al.* (2009) menyatakan bahwa penggunaan bibit vaksin yang tidak sesuai dapat

menurunkan protektivitas vaksin, dan kasus penyakit yang diakibatkan oleh kegagalan vaksinasi mungkin akan semakin sering terjadi. Walaupun unggas yang divaksin tetap tidak menunjukkan gejala klinis yang nyata namun penurunan produksi dan tingginya beban virus (*virus burden*) pada lingkungan dapat menjadi konsekuensi logis yang lebih membahayakan pada penggunaan bibit yang tidak sesuai. Dengan demikian risiko kerugian ekonomi dan kesehatan masyarakat akan tetap tinggi.

Selanjutnya manajemen vaksinasi yang baik akan mengurangi kejadian infeksi di dalam peternakan ayam dan juga mengurangi risiko infeksi manusia dari virus AI yang beredar. Implementasi vaksinasi dapat memproteksi keduanya, dengan satu sasaran besar untuk mengurangi risiko *emergence* dan *pandemic influenza virus* pada manusia. Analisa vaksinasi difokuskan pada biaya, kemanjuran. Evaluasi sebelum dan pasca program vaksinasi harus dilaksanakan dalam penghitungan keuntungan secara keseluruhan di dalam sektor peternakan ayam dan kesehatan manusia (DOMENECH *et al.*, 2009; PEYER *et al.*, 2009).

KESIMPULAN

Penelitian membuktikan bahwa vaksin inaktif AI subtipe H5N1 mampu memberikan perlindungan 100% pada ayam yang divaksin terhadap infeksi virusantang A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan perlindungan 90-100% terhadap infeksi virusantang A/Chicken/West Java/Smi-Mae/2008 serta tanpa terjadi *shedding virus*antang pada hari kedelapan pascatantang. Sementara itu, vaksin inaktif AI H5N2 tingkat perlindungannya mencapai 20-30% terhadap virusantang A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006, dan tingkat perlindungan 70-100% terhadap virusantang A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008, dan vaksin inaktif AI H5N9 tidak memiliki perlindungan (0%) terhadap infeksi virusantang A/chicken/West Java/Smi-Pat/2006 dan tingkat perlindungan 50% terhadap infeksi virusantang A/chicken/West Java/Smi-Mae/2008, serta tidak dapat menghentikan *shedding virus*antang hingga 8 hari setelah infeksi virusantang. Disimpulkan bahwa vaksin AI subtipe H5N1 lebih baik dibandingkan dengan vaksin subtipe lainnya.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini terlaksana atas anggaran penelitian dana DIPA Bbalitvet tahun 2009. Penghargaan dan ucapan terimakasih disampaikan kepada Saudara Heri Hoerudin, Apipudin, dan semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- DOMENECH, J., G. DAUPHIN, J. RUSHTON, J. MCGRANE, J. LUBROTH, A. TRIPODI, J. GILBRET and L.D. SIMS. 2009. Experiences with vaccination in countries endemically infected with highly pathogenic avian influenza: The food and agriculture organization perspective. *Rev. Sci. Tech. Off int. Epiz.* 28: 293-305.
- CHEN, H, G.J.D. SMITH, L.K.S WANG, X.H. FAN, J.M. RAYNER, D. VIJAYKRISHNA, L.J. ZHANG, C.T. GUO, C.L. CHEUNG, K.M. XU, L. DUAN, K. HUANG, K. QIN, Y.H.C LEUNG, W.L.W.H.R. LU, Y. CHEN, N.S. XIA, T.S.P. NAIPOSSOS, K.Y. YUEN, S.S. HASSAN, S. BAHRI, T.D. NGUYEN, R.G. WEBSTER, J.S.M. PEIRIS and Y. GUAN. 2006. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: Implications for pandemic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 2845-2850.
- DHARMAYANTI, N.L.P.I., R. DAMAYANTI, A. WIYONO, R. INDRIANI dan DARMINTO. 2004. Identifikasi virus avian influenza isolat Indonesia dengan *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (PT-PCR). *JITV.* 9: 136-142.
- DAMAYANTI, N.L.P.I., R. DHARMAYANTI, A. WIYONO, R. INDRIANI dan DARMINTO. 2004. Gambaran klinis dan patologis pada ayam yang terserang flu burung sangat patogenik (HPAI) di beberapa peternakan di Jawa timur dan Jawa barat. *JITV.* 9: 128-135.
- DHARMAYANTI, N.L.P.I., R. INDRIANI, R. HARTAWAN, D.A. HEWAJULI, A. RATNAWATI dan DARMINTO. 2008. Pemetaan genetik virus avian influenza di Indonesia 2007. *J. Biol. Indonesia.* V: 155-171.
- DHARMAYANTI, N.L.P.I dan DARMINTO. 2009. Mutasi virus AI di Indonesia *Antigenic Drift Protein Hemagglutinin* (HA) virus influenza H5N1 tahun 2003 - 2006. *Media Kedok. Hewan* 25: 1-8.
- DHARMAYANTI, N.L.P.I. 2009. Perubahan Genoma Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 pada Unggas di Indonesia. *Disertasi.* Program Doktor, Ilmu Biomedik-Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.
- DITJENAK. 2009. Kebijakan Vaksinasi dan Strategi Vaksin Avian Influenza (AI). No. 30099/PD.620/F/9/2009.
- DITJENAK. 2004. Farmakope Obat Hewan Indonesia. Edisi 2. Vaksin Influenza Inaktif. hlm. 73-74.
- DITJENAK. 2011. Situasi Penyakit Avian Influenza Tahun 2011. [http:// Keswan.ditjennak.go.id](http://Keswan.ditjennak.go.id).
- FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION of THE UNITED NATIONS (FAO). 2007. Programmes/Projects. FAO Independent External Evaluation - Livestock and Policy. FAO, Rome.
- INDRIANI, R., N.L.P.I. DHARMAYANTI, L. PAREDE, A. WIYONO dan DARMINTO. 2004. Deteksi respon antibodi dengan uji hemagglutinasi inhibisi dan titer proteksi terhadap virus avian influenza subtipe H5N1. *JITV.* 9: 204-209.
- INDRIANI, R., N.L.P.I. DHARMAYANTI, T. SYAFRIATI, A. WIYONO dan R.M.A. ADJID. 2005. Pengembangan prototipe vaksin inaktif *avian influenza* (AI) H5N1 isolat lokal dan aplikasinya pada hewan coba di tingkat laboratorium. *JITV* 10: 315-321.
- KEMENTERIAN PERTANIAN. 2006. Pedoman pemeliharaan unggas dipemukiman. Peraturan Menteri Pertanian. No 50/Permentan/OT.140/10/2006.
- MAHARDIKA, I.G.N.K., I.N. SUARTHA, I.B.K. SUARDANA dan I.G.A.Y. KENCANA. Perbandingan sekuens konsensus gen hemagglutinin virus avian influenza subtipe H5N1 asal unggas di indonesia dengan subtipe H5N2 dan H5N9. *J. Vet.* 10: 12-16.
- OIE (OFFICE INTERNATIONAL des EPIZOOTIES). 2004. Manual of Standards for Diagnostik Tests and Vaccines. pp. 212-219.
- OFFLU. 2008. Antigenic cartography to aid monitoring antigenic variants in Indonesia. TOT Review.
- PEYER, M., G. FUSHENG, S. DESVAUX dan F. ROGER. 2009. Avian influenza vaccines: a practical review in relation to their application in the field with a focus on the Asian experience. *Epidemiol. Infect.* 137: 1-21.
- POETRI, O.N., A. BOUMA, S. MURTINI, I. CLAASSEN, G. KOCH, R.D. SOEJOEDONO, J.A. STEGEMAN and M. VAN BOVEN. 2009. An inactivated H5N2 vaccine reduces transmission of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus among native chickens. *Vaccine.* 27: 2864-2869.
- SWAYNE, D.E. 2007. Progress Report of Vaccine Efficacy. International Avian Influenza Vaccination. Jakarta 11-12 Juni 2007. FMPI, DEPTAN, USDA.
- SWAYNE, D.E., J.R. BEEK and T.R. MICHICKENLE. 1997. Efficacy of recombinant fowl pox vaccine in protecting chichickenens against highly pathogenic Mexican-origin H5N2 avian influenza virus. *Avian Dis.* 41: 910-922.
- SWAYNE, D.E., C.W. LEE and E. SPACKMAN. 2006. Inactivated North American and European H5N2 avian influenza virus vaccines protect chickens from Asian H5N1 high pathogenicity avian influenza virus. *Avian Pathol.* 35: 141-146.
- SWAYNE, D.E and M. PATINN-JACHICKENWOOD. 2006. Pathogenicity of avian influenza viruses in poultry. *Dev. Biol. (Basel).* 124: 61-67.
- WIYONO, A., R. INDRIANI, N.L.P.I. DHARMAYANTI, R. DAMAYANTI dan DARMINTO. 2004. Isolasi dan karakterisasi virus highly pathogenic avian influenza subtipe H5 dari ayam asal wabah di Indonesia. *JITV.* 9: 61-71.
- WOAH (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH). 2007. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. World Organisation for Animal Health, Paris, France.