

UJI POSTULAT KOCH VIRUS *AVIAN INFLUENZA* SUBTIPE H9N2 A/CHICKEN/SIDRAP/07170094-44O/2017

Ketut Karuni Nayanakumari Natih, Nur Khusni Hidayanto, Ramlah, Cynthia Devy Irawati,
Dina Kartini, Sri Mukartini

Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan
ketutkaruni@yahoo.com

ABSTRAK

Dalam rangka pengendalian penyakit *Avian Influenza* (AI) subtiipe H9N2 yang menyerang beberapa daerah di Indonesia pada akhir tahun 2015, Balai Besar Pengujian Mutu Sertifikasi Obat Hewan mendapat tugas untuk melakukan uji pemurnian isolat A/chicken/Sidrap/07170094-44O/2017 sebagai kandidat *seed* vaksin dan dilanjutkan dengan uji Postulat Koch untuk membuktikan kemurnian kandidat *seed* vaksin AI subtiipe H9N2. Sebanyak 10 ekor ayam SPF umur 25 minggu diinokulasi virus AI subtiipe H9N2 10^6 EID₅₀ secara intranasal. Pengamatan dilakukan selama 21 hari terhadap gejala klinis, produksi telur, dan asupan pakan. Pengambilan darah dilakukan pada pre inokulasi, dan pasca inokulasi hari ke-7, ke-14 dan ke-21. Nekropsi dilakukan pada hari ke-5 dan hari ke-21 pasca inokulasi. Re-isolasi dilakukan dengan menginokulasi suspensi limpa dan *oviduct* pada TAB SPF umur 10 hari. Gejala klinis terlihat adanya diare pada hari pertama, perubahan pada bentuk dan ukuran telur pada hari ke-3, penurunan asupan pakan pada hari ke-4 dan penurunan produksi telur menjadi 66.07 % pada 2 minggu pasca inokulasi. Secara PA ditemukan adanya hyperemia pada trachea, pneumonia, hati rapuh dan kekuningan, hemoragi pada indung telur, penimbunan cairan putih telur pada *oviduct* dan vasa injeksi pada otak. Hasil histopatologi menunjukkan adanya tracheitis, pneumonia hemoragika, hepatitis, salphingitis dan perivascular cuffing dan vaskulitis pada otak. Hasil uji HI pre inokulasi menunjukkan negatif antibodi terhadap antigen AI subtiipe H9N2, H5N1 dan ND, sedangkan pada pasca inokulasi menunjukkan positif antibodi terhadap antigen AI subtiipe H9N2 dan negatif antibodi terhadap antigen AI H5N1 dan ND. Re-isolasi menunjukkan hasil murni virus AI subtiipe H9N2. Uji stabilitas menunjukkan hasil yang stabil dari sampel *master seed*, *working seed* dan Postulat Koch yang homolog 100% pada nukleotida dan asam amino. Berdasarkan hasil uji Postulat Koch tersebut membuktikan bahwa virus AI subtiipe H9N2 A/chicken/Sidrap/07170094-44O/2017 yang sudah murni AI subtiipe H9N2 bisa dijadikan sebagai *seed* vaksin.

Kata kunci : Postulat Koch, *Avian Influenza*, H9N2

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Avian Influenza (AI) merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh virus Influenza tipe A, termasuk dalam keluarga *Orthomyxoviridae*. Virus ini dibedakan menjadi beberapa subtiipe berdasarkan protein antigen yang melapisi permukaan virus yaitu Haemagglutinin (HA) dan Neuraminidase (NA), sehingga penamaan subtiipe berdasarkan HA dan NA, yaitu HxNx, contohnya H5N1, H9N2 dan lain-lain. Menurut patogenisitasnya dapat dibedakan menjadi 2 bentuk yaitu *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) dan *Low Pathogenic Avian Influenza* (LPAI) (Hewajuli dan Dharmayanti 2008; Swayne and Halvorson 2008, OIE 2015).

Penyakit unggas karena virus AI subtype H9N2 awal keberadaannya di Indonesia tidak diketahui dengan pasti karena gejala klinisnya yang hampir

sama dengan beberapa penyakit akibat virus lain. Virus AI sub tipe H9N2 ini telah ada pada akhir tahun 2015, tapi banyak dilaporkan pada tahun 2017 sehingga menjadi perhatian Pemerintah untuk mendapat penanganan khusus.

Laporan kasus terjangkitnya virus H9N2 pertama kali ditemukan di peternakan Sulawesi Selatan, kemudian virus ini menyebar di usaha peternakan petelur di Jawa Timur, Jawa Tengah hingga ke Banten. Saat ini sudah hampir menyebar ke seluruh propinsi di Indonesia. Penyakit ini kebanyakan menyerang ayam petelur umur 36-60 minggu. Mortalitas umumnya rendah sebesar < 5-10 %, ditandai dengan gejala penurunan produksi telur sampai 40-60% dari produksi yang normal, sehingga menimbulkan kerugian ekonomi bagi peternak. Sepanjang tahun 2017 telah dilakukan surveilans virus AI sub tipe H9N2 oleh Balai Veteriner Kementerian Pertanian di Sulawesi Selatan, Jawa Barat, Bali, Jawa Tengah dan DI Yogyakarta.

Usaha Pemerintah untuk memberantas dan mencegah penyakit AI sub tipe H9N2 adalah dengan program vaksinasi. Produksi vaksin AI sub tipe H9N2 memerlukan waktu, terutama untuk proses isolasi, purifikasi dan karakterisasi virus. Vaksin yang diproduksi secara nasional harus aman dan berkualitas. (Anonim 2017)

Tujuan

Dalam rangka pengendalian penyakit AI sub tipe H9N2 tersebut, Balai Besar Pengujian Mutu Sertifikasi Obat Hewan (BBPM SOH) mendapat tugas untuk melakukan uji validasi, pemurnian isolat A/chicken/Sidrap/07170094-44O/2017 sebagai kandidat *seed* vaksin dan dilanjutkan dengan uji Postulat Koch untuk membuktikan kemurnian kandidat *seed* vaksin AI sub tipe H9N2.

MATERI DAN METODA

Bahan yang digunakan dalam uji Postulat Koch (PK) adalah 20 ekor ayam *Specific Pathogen Free* (SPF) umur 25 minggu dengan produktivitas telur kurang lebih 85%, isolat virus AI sub tipe H9N2 A/chicken/Sidrap/07170094-44O/2017, antigen AI sub tipe H9N2, antigen H5N1 (AI *clade* 2.1.3 A/chicken/West Java-Subang/29/2007 dan AI *clade* 2.3.2 strain A/duck/Sukoharjo/BBVW1428-9/2012, antigen *Newcastle Disease* (ND), TAB SPF umur 9-10 hari, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), sel darah merah dari ayam SPF, media virus, formalin 10%, organ limpa dan *oviduct* yang diambil dari ayam pada hari ke-5 pasca inokulasi virus. Reagen ekstraksi *Polymerase Chain Reaction* (PCR), primer H9N2 (AAHL In House , Fereidouni et al, 20019) dan sequencing.

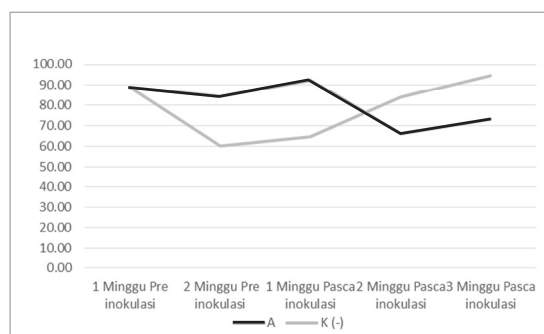
Pengujian Postulat Koch dilakukan didalam fasilitas *Biosafety Level-3* (BSL-3). Prosedur uji PK adalah sebagai berikut: sebanyak 10 ekor ayam

SPF umur 25 minggu diinokulasi sebanyak 0.1 mL virus AI sub tipe H9N2 10^6 EID₅₀ secara intranasal, sedangkan 10 ekor lainnya sebagai kelompok kontrol. Pengamatan dilakukan selama 21 hari terhadap gejala klinis, produksi telur, dan asupan pakan. Pengambilan darah dilakukan pada pre inokulasi, dan pasca inokulasi hari ke-7, 14 dan 21 untuk selanjutnya dilakukan uji hambatan hemaglutinasi (*Hemagglutination Inhibition/HI*). Nekropsi dilakukan pada hari ke-5 dan hari ke-21 pasca inokulasi. Re-isolasi dilakukan dengan inokulasi suspensi limpa dan *oviduct* pada TAB SPF umur 10 hari. Uji stabilitas dilakukan terhadap *seed* awal (*master seed/MS*), pasase di TAB SPF (*working seed/WS*) dan pasase di ayam SPF (hasil re-isolasi dari limpa ayam uji PK) dengan metode PCR konvensional yang dilanjutkan dengan sequencing. Selanjutnya hasil sequencing di analisa bioinformatika untuk mengetahui apakah ketiga sampel tersebut homolog meskipun telah dilakukan perlakuan yang berbeda (OIE 2015).

HASIL

Pengamatan pada uji Postulat Koch terhadap gejala klinis adalah, diare pada hari pertama, penurunan nafsu makan pada hari ke-4, perubahan pada bentuk telur pada hari ke-3 dan penurunan produksi telur pada 2 minggu pasca inokulasi. Perubahan pada telur yang teramati seperti kerabang kasar dan tidak rata, kerabang tipis, dan telur yang tidak berkerabang. Ukuran telur juga kelihatan lebih kecil dari ukuran normal.

Rataan produksi telur pada kelompok inokulasi virus 1 minggu dan 2 minggu pre inokulasi adalah 88.57% dan 84.29%, sedangkan menjelang inokulasi sebesar 92.14 %. Pada 2 minggu pasca inokulasi produksi telur mengalami penurunan menjadi 66.07%. Produksi telur meningkat kembali pada pengamatan minggu ketiga menjadi 73.21% (Gambar 1).



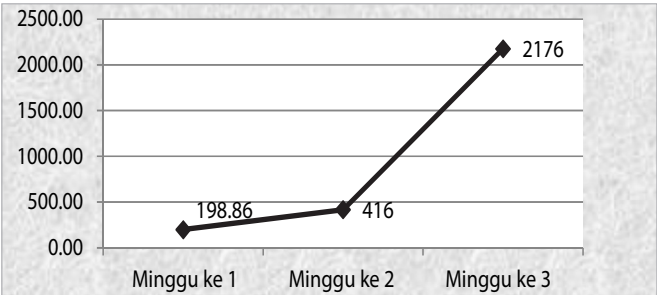
Gambar 1. Rataan Produktivitas Telur

Hasil titer antibodi uji Postulat Koch dapat dilihat pada Tabel 1. Titer antibodi pre inokulasi menunjukkan negatif antibodi terhadap antigen AI sub tipe H9N2, H5N1 dan ND yaitu <8, sedangkan pada pasca inokulasi

menunjukkan positif antibodi terhadap antigen AI sub tipe H9N2 dengan nilai titer >16. Titer antibodi pasca inokulasi juga negatif antibodi terhadap antigen AI H5N1 dan ND. Pada Gambar 2 terlihat rata-rata titer antibodi yang meningkat dari minggu ke-1 sampai ke-3 pasca inokulasi,yaitu sebesar 198.86 menjadi 416 dan 2176.

Tabel 1. Hasil Titer Antibodi Uji Postulat Koch dengan Uji Hambatan Hemaglutinasi

No	Kode Ayam	Titer HI Pre in- okulasi			Titer HI Hr ke-7 Pasca Inokulasi		Titer HI Hr ke-14 Pasca Inokulasi		Titer HI Hr ke-21 Pasca inokulasi		
		Virus H9N2	Ag H5N1	Virus ND	H9N2	H5N1	H9N2	H5N1	Virus H9N2	Ag H5N1	Virus ND
1	911	<8	<8	<8	nekropsi	nekropsi	nekropsi	nekropsi	nekropsi	nekropsi	nekropsi
2	912	<8	<8	<8	16	<8	128	<8	1024	<8	<8
3	913	<8	<8	<8	32	<8	128	<8	1024	<8	<8
4	914	<8	<8	<8	<8	<8	256	<8	1024	<8	<8
5	915	<8	<8	<8	512	<8	1024	<8	4096	<8	<8
6	916	<8	<8	<8	256	<8	512	<8	4096	<8	<8
7	917	<8	<8	<8	nekropsi	nekropsi	nekropsi	nekropsi	nekropsi	nekropsi	nekropsi
8	918	<8	<8	<8	256	<8	256	<8	4096	<8	<8
9	919	<8	<8	<8	64	<8	512	<8	1024	<8	<8
10	920	<8	<8	<8	256	<8	512	<8	1024	<8	<8



Gambar 2. Rataan Titer Antibodi Pasca Inokulasi

Hasil nekropsi menunjukkan gejala klinis penyakit AI sub tipe H9N2 dengan perubahan Patologi Anatomi (PA) sebagai berikut : ditemukan adanya hiperemia pada trachea, pneumonia, hati rapuh dan kekuningan, hemoragi pada indung telur, penimbunan cairan putih telur pada oviduct dan vasa injeksi pada otak. Secara histopatologi : ditemukan adanya hemoragi pada tunika mukosa trachea, adanya kongesti, hemoragi disertai infiltrasi sel-sel radang limfosit pada dinding alveoli dan bronchiolus paru-paru, adanya infiltrasi limfosit pada tunika muskularis oviduct, adanya infiltrasi limfosit, hemoragi, nekrosis pada hepatosit hati dan adanya kongesti, hemoragi,

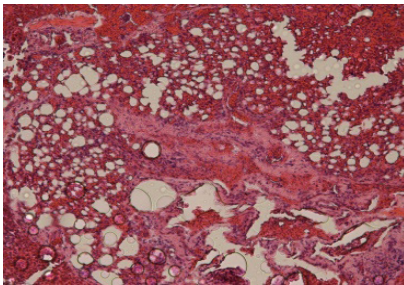
infiltrasi limfosit di sekitar dinding pembuluh darah (*perivascular cuffing*) dan vasculitis paracelebrum otak (Gambar 3).



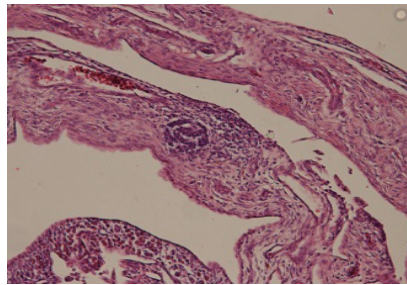
Vasa injeksi otak



Penimbunan cairan putih telur pada *oviduct*



Hemoragi, edema, infiltrasi sel-sel mononuclear dan polymorphonuclear pada alveolus



Infiltrasi sel-sel mononuclear pada infundibulum

Gambar 3. Beberapa Gambaran Patologi dan Histopatologi

Pengamatan kematian embrio tahap isolasi virus AI H9N2 kembali (re-isolasi) dari organ limpa dan *oviduct* yang diinokulasikan ke TAB SPF terjadi pada hari ke-4 pasca inokulasi. Secara serologi dari organ limpa menunjukkan positif virus H9N2 dengan titer HA lambat 128 dan HI 512. Sedangkan dari organ *oviduct* juga menunjukkan positif virus H9N2 dengan titer HA lambat 128 dan HI 512..Hasil re-isolasi yang diuji secara molekuler dengan PCR menunjukkan positif virus H9N2 pada 682 bp (H9) dan 362 bp (N2).

Uji stabilitas dilakukan dengan metode PCR terhadap 3 sampel yaitu MS, WS dan hasil re-isolasi dari limpa ayam uji PK yang menunjukkan hasil positif terhadap virus AI sub tipe H9N2 (Tabel 2). Dari PCR dilanjutkan ke sequencing. Hasil sequencing sampel MS dan PK diperoleh panjang nukleotida 650 pada gen HA. Homologi nukleotida dan asam amino dari ketiga sampel tersebut adalah 100%. Analisis residu asam amino pada bagian *Reseptor Binding Site* (RBS) ketiga sampel menunjukkan hasil yang

sama. Pada asam amino nomor 234 diperoleh Leusin (L) dan asam amino nomor 236 diperoleh Glycine (G). Analisis asam amino pada *Cleavage Site* (CS) dari ketiga sampel menunjukkan hasil yang sama yaitu pada asam amino nomor 333 – 338 adalah PSRSSR yang bersifat *monobasic* yang menunjukkan bahwa ketiga sampel merupakan LPAI.

Tabel 2. Hasil Uji Stabilitas dengan Metode PCR

No	Sampel	H9	N2
1	A/chicken/Sidrap/07170094-44O/2017 (MS)	+682bp	+362 bp
2	A/chicken/ Sidrap/07170094-44O/2017 (WS)	+682bp	+362 bp
3	A/chicken /Sidrap/07170094-44O/2017(PK)	+682bp	+362 bp

PEMBAHASAN

Adanya kajian kasus penurunan produksi telur pada peternakan ayam yang disebabkan virus AI sub tipe H9N2, membuat Pemerintah untuk menetapkan program vaksinasi dengan menggunakan *seed* lokal. Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan mendapat tugas untuk menyiapkan *seed* vaksin AI sub tipe H9N2. Proses pembuatan *seed* vaksin ini membutuhkan waktu yang panjang karena melalui proses validasi, pemurnian dan karakterisasi dengan uji Postulat Koch..

Zhao et al 2016 mengatakan sebagian besar ayam yang terpapar virus AI sub tipe H9N2 tidak menginduksi tanda-tanda klinis atau kematian pada ayam, meskipun ada beberapa isolat menunjukkan patogenisitas pada ayam dan hampir semuanya ayam yang terinfeksi akan melepaskan virus/*shedding* dari trachea. Temuan ini menunjukkan bahwa penyakit atau kematian dipeternakan unggas tempat asal virus H9N2 ini diisolasi tidak disebabkan oleh virus H9N2 saja tapi juga disebabkan oleh koinfeksi dengan patogen lainnya seperti ND, *Infectious Bronchitis* (IB) dan *Egg Drop Syndrome* (EDS). Sehingga pelaksanaan uji PK dengan fasilitas BSL-3 dengan menggunakan ayam/telur SPF.

Gejala klinis awal dari terpaparnya virus AI sub tipe H9N2 menyebabkan struktur feses ayam menjadi lebih encer dan menurunnya nafsu makan sehingga asupan pakan berkurang. Produksi telur pada ayam layer menurun karena virus AI sub tipe H9N2 menyerang *oviduct*. Awal infeksi virus AI sub tipe H9N2 menyebabkan bentuk dan ukuran telur berubah. Kerabang telur menipis sampai telur tidak berkerabang.

Nekropsi dilakukan pada hari ke-5 saat masa inkubasi virus AI sub tipe H9N2 untuk melihat perubahan pada organ tubuh. Hasil patologi anatomi adalah ditemukan adanya hiperemia pada trakhea, pneumonia, hati rapuh

dan kekuningan, hemoragi pada indung telur, penimbunan cairan putih telur pada oviduct dan vasa injeksi pada otak. Perubahan itu adalah khas pada ayam layer yang terserang oleh virus AI sub tipe H9N2. Virus AI sub tipe H9N2 merupakan jenis virus influenza yang bersifat LPAI, meskipun tidak mematikan akan tetapi dapat menyebabkan penurunan kekebalan tubuh unggas dan kerusakan pada beberapa organ (Anonim 2017)

Pengambilan darah pre inokulasi untuk mengetahui titer awal dari ayam yang akan diinokulasi dengan virus AI sub tipe H9N2. Hasil titer antibodi pre inokulasi negatif antibodi terhadap antigen AI sub tipe H9N2, H5N1 dan ND. Hasil ini menunjukkan bahwa kelompok ayam yang digunakan bebas dari paparan virus AI sub tipe H9N2, H5N1 dan ND. Nilai titer antibodi pasca inokulasi positif antibodi terhadap antigen AI sub tipe H9N2 dengan nilai titer ≥ 16 , negatif terhadap antigen H5N1 dan ND. Nilai titer antibodi meningkat dari 1 minggu sampai 3 minggu pasca vaksinasi dengan rata-rata 198.86 menjadi 416 dan 2176. Menurut Hadipour et al 2011, titer antibodi yang positif menandakan bahwa dalam tubuh hewan terdapat antibodi yang menunjukkan telah terjadi infeksi atau paparan virus AI sub tipe H9N2 pada tubuh hewan. Nilai titer antibodi meningkat diperoleh dari sistem pertahanan tubuh yang merespon paparan virus AI yang diinokulasi.

Re-isolasi bertujuan untuk melihat apakah perubahan yang ditimbulkan akibat inokulasi virus AI sub tipe H9N2 murni atau sama dengan virus yang diinokulasikan. Kematian embrio yang diawali pada hari ke-4 merupakan gejala dari virus LPAI. Hasil re-isolasi secara biakan didalam inang asli dengan menggunakan TAB SPF dan secara molekuler dengan PCR menunjukkan positif virus AI sub tipe H9N2. Adapun untuk uji stabilitas virus sangat penting dilakukan untuk mengetahui apakah virus H9N2 yang diuji, tetap sama dari awal sampai setelah dilakukan pasase baik di telur maupun di ayam. Uji stabilitas ini diperlukan untuk memastikan tidak adanya perubahan dari virus saat nanti dijadikan sebagai *master seed* dalam pembuatan vaksin.

Gen hemagglutinin (HA) merupakan bagian dari virus influenza yang berperan dalam proses penempelan pada sel reseptor inang dan berperan penting dalam pelepasan RNA virus ke dalam sel dengan cara menggabungkan virus dan membrane sel inang. Virus influenza yang tidak mengalami pembelahan pada gen HA sehingga tidak menghasilkan protein HA1 dan HA2 tidak akan terjadi penggabungan antara virus dan membran sel inang sehingga tidak bersifat infeksius. Begitu pentingnya terjadi proses pembelahan pada gen HA di bagian CS maka asam amino di CS sangat penting di analisa yang merupakan salah satu cara menggolongkan suatu sub tipe virus influenza termasuk HPAI atau LPAI. Pada LPAI sub tipe H9N2 tidak terdapat pengulangan asam amino arginin (R) dan Lysine (K), bersifat *monobasic* asam amino yaitu RSSR. Analisis asam amino pada CS dari

ketiga sampel menunjukkan hasil yang sama yaitu pada asam amino nomor 333 – 338 adalah PSRSSR yang bersifat *monobasic* yang menunjukkan bahwa ketiga sampel merupakan virus LPAI.

Dengan adanya virus AI sub tipe baru ini di Indonesia maka Pemerintah melakukan langkah-langkah untuk mengendalikan virus ini. Pengendalian infeksi virus AI sub tipe H9N2 selain dengan program vaksinasi juga adanya penerapan tindakan biosekuriti yang ketat, perbaikan mutu pakan, pemberian vitamin dan pemberian imunostimulan. Ditjen PKH Kementerian Pertanian melalui sistem *Influenza Virus Monitoring online* (IVM) telah membangun sistem pengawasan penyebaran virus flu burung, sehingga dapat dilakukan analisa melalui identifikasi, karakterisasi dan sequencing DNA (Anonim 2017). Selain itu peranan unggas lain juga harus diperhatikan. Zhao et al (2016) mengatakan bahwa virus AI sub tipe H9N2 pada bebek bisa ditransmisikan ke ayam, dan ayam yang terinfeksi dapat melepaskan virus untuk waktu yang lama, sehingga menyebabkan sirkulasi penularan virus di antara bebek dan ayam.

Pemantauan secara terus menerus pada unggas penting untuk mencegah munculnya virus AI sub tipe H9N2, karena virus AI sub tipe H9N2 dapat melakukan gabungan dengan sub tipe virus influenza A lainnya, menghasilkan virus influenza baru. H9N2 adalah donor gen internal untuk virus H5N1, H7N9, dan H10N8 (Lin et al 2017). Gen-gen tersebut dapat membuat virus semakin berbahaya. Seluruh virus itu bisa menjadi pandemik jika berhasil melakukan mutasi yang tepat untuk menyebar pada manusia, atau bergabung dengan virus flu umum milik manusia.

Dengan tersediannya *seed* vaksin AI sub tipe H9N2 lokal A/chicken/Sidrap/07170094-44O/2017 ini diharapkan dapat digunakan sebagai *seed* vaksin nasional yang aman dan berkualitas yang diproduksi sehingga dapat mengendalikan penyakit AI sub tipe H9N2 di Indonesia.

KESIMPULAN

Pengamatan gejala klinis uji Postulat Koch terlihat adanya diare pada hari pertama, perubahan pada bentuk dan ukuran telur pada hari ke-3, penurunan asupan pakan pada hari ke-4 dan penurunan produksi telur menjadi 66.07 % pada 2 minggu pasca inokulasi.

Secara PA ditemukan adanya hiperemia pada trachea, pneumonia, hati rapuh dan kekuningan, hemoragi pada indung telur, penimbunan cairan putih telur pada *oviduct* dan vasa injeksi pada otak. Hasil histopatologi menunjukkan adanya tracheitis, pneumonia hemoragika, hepatitis, salphingitis dan perivascular cuffing dan vaskulitis pada otak.

Hasil uji HI pre inokulasi menunjukkan negatif antibodi terhadap antigen AI sub tipe H9N2, H5N1 dan ND, sedangkan pada pasca inokulasi menunjukkan positif antibodi terhadap antigen AI sub tipe H9N2 dan negatif antibodi terhadap antigen AI H5N1 dan ND.

Re-isolasi menunjukkan hasil murni virus AI sub tipe H9N2. Uji stabilitas menunjukkan hasil yang stabil dari sampel *master seed*, *working seed* dan Postulat Koch yang homolog 100% pada nukleotida dan asam amino.

Berdasarkan hasil uji Postulat Koch tersebut membuktikan bahwa virus AI sub tipe H9N2 A/chicken/Sidrap/07170094-44O/2017 yang sudah murni AI sub tipe H9N2, sehingga isolat tersebut dapat dijadikan sebagai *seed* vaksin AI sub tipe H9N2 untuk produksi vaksin nasional.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Balai Besar Veteriner Maros, Balai Besar Veteriner Wates, Pusvetma dan PT Vaksindo

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2017. Virus LPAI H9N2 Menyerang Unggas, Peternak Diminta Perketat Biosecurity [diunduh 2018 Maret 27]. Tersedia pada <http://www.trobos.com/detail-berita/2017/12/29/57/9681/virus-lpai-h9n2-menyering-unggas-peternak-diminta-perketat-biosecurity>
- Fereidouni SR, Starick E, Grund C, Globig A, Mettenleiter TC, Beer M, Harder T. 2009. Rapid molecular subtyping by reverse transcription polymerase chain reaction of the neuraminidase gene of avian influenza A viruses. *Veterinary Microbiology* 135: 253–260
- Hadipour MM, Habibi G, Vosoughi A. 2011. Prevalence of antibodies to H9N2 AIV in backyard chickens around Maharlo Lake in Iran. *Pak Vet J*. 31: 192-194
- Hewajuli DA, Dharmayanti NLPI. 2008. *Wartazoa*. 4(2).
- Lin TN, Nonthabenjawan N, Chaiyawong S, Bunpapong N, Boonyapisitsopa S, Janetanakit T, Mon PP, Mon HH, Oo KN, Oo SM, Mar Win M, Amonsin A. 2017. Influenza A (H9N2) Virus, Myanmar, 2014–2015. *Emerg Infect Dis*. 23(6):1041-1043.
- OIE. 2015. Avian Influenza (Infection With Avian Influenza Viruses). Chapter 2.3.4

- Swayne DE, Halvorson DA. 2008. Influenza In: Saif, YM; Barnes HJ; Fadl AM; Glisson JR; McDougald LR and Swayne DE (Eds). Disease of poultry. (12th Edn). Ames Iowa State University Press. 153-184.
- Tavakkoli H, Asasi K, Mohammadi A. 2011. Effectiveness of two H9N2 low pathogenic Avian Influenza conventional inactivated oil emulsion vaccines on H9N2 viral replication and shedding in broiler chickens. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 12(3).
- Wiyono A, Indriani R, Dharmayanti NLPI, Damayanti R, Parede L, Syafriati T, Darminto. 2004. Isolasi dan karakterisasi virus Highly Pathogenic Avian Influenza Subtipe H5 dari ayam asal wabah di Indonesia. *JITV*. 9 (1).
- Zhao K, Jin C, Huang Y, Zang H, Xue J, Tian H, Yuan Y, Li X, Liu W, Tian K. 2016. Pathogenicity of duck-originated H9N2 influenza viruses on chickens. *Journal of Vaccines and Immunology* 2(1): 023-025.