

Deteksi Virus Avian Influenza H5N1 pada Anak Ayam Umur Satu Hari dengan Teknik Immunohistokimia

(DETECTION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS H5N1 IN DAY OLD CHICK (DOC)
BY USING IMMUNOHISTOCHEMISTRY TECHNIQUE)

**Sophia Setyawati^{1,1a}, Retno Damajanti Soejoedono²,
Ekowati Handharyani³, Bambang Sumiarto⁴**

¹Pusat Karantina Hewan, Badan Karantina Pertanian

Jl. Harsono RM No. 3 Gedung E Lt 5. Kampus Deptan, Jakarta Selatan

^{1a} Mahasiswa Sekolah Pascasarjana Program Studi Sain Veteriner Institut Pertanian, Bogor

²Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesmavet,

³Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB,

⁴Laboratorium Kesmavet FKH Universitas Gajah Mada, Yogyakarta

Email : sophia_setyawati@yahoo.com

ABSTRACT

Avian Influenza (AI) or bird flu caused by virus H5N1 is still present in Indonesia. The Department of Agriculture of Indonesia has banned poultry distribution from endemic to non endemic area, except for distribution of day old chick (DOC). The aim of this research was to detect AI virus infection in DOC distributed from AI endemic to AI non endemic areas. Two hundred and forty DOCs from farms in West Java and Banten were collected from Soekarno Hatta airport. Their antibody titers were examined against AI virus by Haemagglutination Inhibition (HI) test. The AI virus detected in tissues (trachea, lung, heart, kidney, liver, and intestine) by immunohistochemistry technique. Detection of AI virus using anti AI H5N1 monoclonal antibody was conducted AEC as chromogen. The result showed that 66,2% of DOC were positive AI and 33,8% were negative AI. The 66,2% of positive samples, 43,3% showing the presence of AI antigen in trachea, lung and intestine, and 22,9% were presence in liver and kidney. DOCs were infected AI virus with subclinical symptoms and they were potential as the source of rapid AI spread in Indonesia. It is therefore important to take a very cautious measure to prevent the spread of AI via DOC from AI endemic to free area.

Key words : DOC, AI virus, immunohistochemistry, monoclonal antibody H5N1

ABSTRAK

Avian influenza (AI) atau Flu Burung disebabkan oleh virus AI subtype H5N1 masih ada di Indonesia. Departemen Pertanian telah melarang peredaran unggas dari daerah endemik ke daerah non endemik kecuali peredaran anak ayam umur satu hari/*day old chick* (DOC). Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi kemungkinan infeksi virus AI pada DOC yang akan didistribusikan dari daerah endemik AI ke daerah non endemik AI. Sebanyak 240 ekor DOC yang berasal dari peternakan di daerah Jawa Barat dan Banten diambil di Bandar Udara Soekarno Hatta. Setiap DOC diukur titer antibodi terhadap AI dengan uji hemaglutinasi inhibisi (HI). Virus AI pada beberapa organ (*trakea*, paru-paru, usus, hati, ginjal) dideteksi menggunakan teknik pewarnaan imunohistokimia. Deteksi virus AI menggunakan antibodi monoklonal AI H5N1 dengan kromogen (AEC) memberi warna kemerahan pada virus AI. Hasil penelitian diketahui bahwa 66,2% sampel positif antigen AI H5N1 pada organ dan 33,8% sampel negatif. Dari 66,2% sampel positif diketahui bahwa 43% menunjukkan keberadaan antigen pada *trakea*, paru-paru dan usus dan 22,9% ditemukan pada hati dan ginjal. Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa anak ayam umur satu hari telah terinfeksi oleh virus AI dengan gejala subklinis dan anak ayam umur satu hari ini berpotensi sebagai salah satu penyebab cepatnya penyebaran AI di Indonesia, sehingga perlu diwaspadai pendistribusiannya ke daerah bebas AI.

Kata kunci : DOC, virus AI, imunohistokimia, antibodi monoklonal H5N1

PENDAHULUAN

Virus AI patogenitas tinggi atau *Highly Pathogenic Avian Influenza* (HPAI) saat ini telah menyebar hampir ke seluruh Indonesia dan berdampak sangat merugikan peternakan unggas serta telah menyebabkan kematian pada manusia di beberapa daerah. Penanganan yang serius perlu segera dilakukan agar wabah AI tidak berkembang menjadi pandemi influenza. Pandemi influenza akan berdampak sangat besar, mengakibatkan kerugian ekonomi karena banyaknya unggas yang harus dimusnahkan serta kerugian sosial karena banyaknya manusia yang sakit bahkan meninggal dunia. Pada tahun 1997 wabah HPAI yang disebabkan oleh subtipe H5N1 telah mengakibatkan 6 orang meninggal dunia di Hongkong (Suarez *et al.*, 1998).

Kejadian HPAI di Indonesia diyakini berawal pada bulan Agustus 2003 pada peternakan ayam ras komersial di Jawa Barat dan Jawa Tengah yang kemudian meluas di seluruh Jawa, Bali, dan beberapa daerah di Sumatera dan Kalimantan. Jumlah kematian unggas meningkat dan menyebar ke-16 propinsi yang mencakup 100 kabupaten/kota pada tahun 2004. Jika dilihat dari jumlah kematian unggas, mulai bulan Agustus 2003 hingga November 2005, cenderung mengalami penurunan meski wilayah yang terjangkit cenderung meluas. Secara resmi Menteri Pertanian pada bulan Januari 2004 mengumumkan bahwa virus AI subtipe H5N1 telah masuk di Indonesia, dan sampai saat ini virus tersebut dinyatakan endemik di 31 dari 33 propinsi di Indonesia.

Menurut Wibawan (2006), infeksi virus AI saat ini berbentuk subklinis, yaitu hewan terlihat sehat tetapi sebenarnya sakit. Adanya kasus penyakit yang tidak terdeteksi dengan tepat menyebabkan meluasnya kasus AI di lapangan. Tingginya tingkat infeksi virus AI juga memungkinkan virus ini bertahan dan memunculkan *strain* virus yang lebih patogen melalui proses mutasi dan/atau *genetic reassortment*. Diversitas genetik virus *avian influenza* pada *reservoir* hewan liar kemungkinan juga berperan penting dalam proses keberlangsungan hidup virus AI di alam (Easterday *et al.*, 1997).

Berbagai usaha telah dilakukan untuk memberantas dan mencegah penyebarannya, namun sepertinya penyakit yang disebabkan oleh virus RNA dalam famili *Orthomyxoviridae* ini sulit sekali diberantas. Tindakan pencegahan

melalui pengaturan distribusi unggas ke daerah telah dilakukan oleh pemerintah dengan melarang peredaran unggas dan hanya mengizinkan lalulintas anak ayam umur satu hari (*day old chick*, DOC), anak itik umur satu hari (*day old duck*, DOD), telur dan pakan ternak dari daerah tertular ke daerah bebas dengan persyaratan tertentu. Peraturan ini dibuat dengan pertimbangan untuk memenuhi kebutuhan konsumen di daerah yang masih bebas yang tidak memiliki peternakan komersial karena sentra industri peternakan unggas sebagian besar terletak di Pulau Jawa yang merupakan daerah tertular. Namun, sampai saat ini belum diketahui dengan pasti mengapa wabah flu burung cepat sekali menyebar ke seluruh wilayah Indonesia, walaupun pemerintah Indonesia telah mengupayakan pencegahan dan pengendaliannya. Kondisi ini sangat memprihatinkan karena banyaknya dugaan tentang penyebaran virus AI tersebut sehingga menyebabkan masyarakat takut mengkonsumsi dan berdekatan dengan unggas.

Food and Agriculture Organization melaporkan kejadian dan uji eksperimental yang mengindikasikan bahwa virus AI dapat diisolasi dari kuning dan putih telur ayam di daerah wabah AI (FAO, 2006). Keberadaan virus AI pada telur dilaporkan pula oleh Naruepol (2006), bahwa virus AI ditemukan dalam campuran albumin dan cairan alantois serta *oviduct* burung puyuh jepang (*Coturnix coturnix japonica*) yang terinfeksi secara alami. Bukti awal lapang dan analisis data laboratorium mengindikasikan bahwa virus dapat ditemukan di dalam kuning dan putih telur yang dihasilkan oleh kelompok ayam pada situasi puncak infeksi AI. Kemungkinan terjadinya penularan vertikal telah dikhawatirkan oleh para pakar, tetapi belum dapat dibuktikan secara pasti (Akoso, 2006). FAO (2008) melaporkan bahwa kemungkinan DOC terinfeksi virus AI sangat kecil tetapi DOC dapat menyebarkan AI karena terkontaminasi saat transportasi atau terinfeksi setelah penetasan.

Anak ayam yang induknya telah divaksinasi menunjukkan titer antibodi yang protektif. Anak ayam memperoleh antibodi IgG dari kuning telur (Tizard, 2009). Imunoglobulin ini diturunkan dari induk selama telur masih berada dalam ovarium, tetapi antibodi maternal hanya mampu melindungi anak ayam dalam kurun waktu yang singkat sehingga masih memungkinkan untuk terpapar dengan virus AI. Oleh karena itu penelitian ini diharapkan

dapat mengungkap adanya kemungkinan DOC terinfeksi atau membawa virus AI dengan mengamati keberadaan virus secara *insitu* dengan metode pewarnaan imunohistokimia.

METODE PENELITIAN

Sampel DOC

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah DOC *final stock* (FS) *layer* dan *broiler* yang berasal dari perusahaan pembibitan di daerah Jawa Barat dan Banten yang akan didistribusikan ke luar Pulau Jawa melalui Bandar Udara Soekarno Hatta.

Pengambilan sampel dilakukan pada bulan April sampai dengan September 2008 dengan jumlah sampel sebanyak 240 ekor DOC. Setiap DOC diambil darahnya untuk dianalisis titer antibodi terhadap AI, kemudian disembelih dan diambil organnya untuk dianalisis keberadaan virus AI dengan teknik pewarnaan imunohistokimia.

Uji Serologis

Darah diambil dari jantung menggunakan jarum suntik 1 ml (Terumo) kemudian dibiarkan beberapa saat pada suhu ruang sampai terbentuk serum. Uji Hemaglutinasi Inhibisi (HI) dilakukan untuk mengukur titer antibodi terhadap virus AI menggunakan antigen AI H5N1 dan diamati adanya hambatan agglutinasi (OIE, 2005).

Sampel Organ

DOC yang telah diambil darahnya kemudian dipotong dan diambil organnya (trakhea, paru-paru, usus, hati dan ginjal), selanjutnya dibuat preparat histologi untuk melihat keberadaan virus *in situ* secara imunohistokimia.

Pembuatan Preparat Histologi

Organ yang diperoleh dipotong setebal 0,5 cm dan difiksasi dalam larutan *buffered neutral formalin* (BNF) 10% selama minimal 24 jam kemudian diproses menjadi blok parafin dan dipotong setebal 3-4 μm lalu ditempelkan dalam *slide* preparat yang sebelumnya dilapisi dengan gelatin dan khromium potasium sulfat ($\text{CrK}(\text{SO}_4)$). Selanjutnya, preparat dideparafinisasi dan rehidrasi sebelum dilakukan pewarnaan secara imunohistokimia dan hematoksilin eosin (HE).

Pewarnaan Imunohistokimia

Metode pewarnaan deteksi *avian influenza* ini mengacu pada metode Temasek Laboratorium Singapura dengan menggunakan citrat buffer untuk *unmasking* antigen *retrieval* dan proses selanjutnya menggunakan kit DakoCytomation. Bloking aktivitas endogenus dengan menggunakan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% selama 20 menit kemudian dicuci dengan PBS tween selanjutnya direndam dalam susu skim 0,1% selama 30 menit dan dicuci kembali dengan PBS tween. Antibodi primer yang digunakan adalah antibodi monoklonal H5N1 (Astawa *et al.*, 2007) dan diinkubasi selama 24 jam di suhu 4°C. Setelah 24 jam preparat dibilas dengan PBS tween kemudian ditambahkan antibodi sekunder yang akan berikatan dengan antibodi primer, dan selanjutnya diinkubasi selama 1 jam. Pewarnaan menggunakan *Amino Ethyl Carbazole* (AEC) sebagai kromogen dilakukan setelah antibodi sekunder dibilas dengan *distillated water* (DW). *Counterstain* menggunakan *Lillie Mayer Hematoksilin* untuk mendapatkan warna kebiruan sebagai latar belakang jaringan dan antigen yang telah terwarnai dengan kromogen akan berwarna kemerahan. Preparat yang telah diwarnai kemudian diamati dengan mikroskop. Hasil dinyatakan positif apabila ditemukannya antigen yang berwarna kemerahan dan negatif apabila tidak ditemukan antigen sehingga preparat hanya tampak berwarna kebiruan.

Pewarnaan Hematoksilin Eosin

Pewarnaan hematoksilin eosin (HE) dilakukan untuk melihat perubahan patologi jaringan akibat virus AI. Pada pewarnaan HE ini sel akan terwarnai kebiruan dan sitoplasma akan berwarna merah muda.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Titer Antibodi terhadap Virus AI Subtipe H5N1

Sebanyak 240 sampel diperiksa titer antibodi terhadap virus AI H5N1 dengan uji HI (log 2) dan diperoleh titer antibodi yang bervariasi antara titer 0 sampai 10 (log 2) seperti yang terlihat pada Tabel 1.

Pada Tabel 1 terlihat bahwa titer antibodi 2³ (8) paling banyak terdapat pada penelitian ini. Menurut Kumar *et al* (2007) ayam dengan titer antibodi lebih rendah dari 10 maupun negatif tidak mampu melindungi ayam dari infeksi

virus AI, tetapi dapat mencegah infeksi dan *shedding* virus.

Antibodi yang terdapat pada DOC merupakan antibodi asal induk. Anak ayam memperoleh antibodi IgG dari kuning telur, imunoglobulin ini diturunkan dari induk selama telur masih dalam ovarium (Tizard, 2009). Vaksinasi pada unggas diharapkan dapat meningkatkan kekebalan unggas terhadap paparan virus dan mengurangi tingkat *shedding* virus sehingga mencegah kasus penyakit (Capua dan Maragon, 2007). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa titer antibodi yang bervariasi mulai dari 2⁰ sampai 2⁹ ini tidak mempengaruhi keberadaan virus (antigen) pada organ DOC.

Deteksi Virus AI Subtipe H5N1 dengan Teknik Pewarnaan Imunohistokimia

Hasil pewarnaan imunohistokimia (IHK) diperoleh hasil positif sebanyak 66,2% dan negatif 33,8%. Dari hasil positif tersebut, antigen terbanyak terdapat di trakhea, paru-paru dan usus (43,3%), sedangkan pada hati dan ginjal jarang ditemukan (22,9%). Antigen yang bereaksi dengan antibodi terwarnai coklat kemerahan (Gambar 1), pada setiap organ terdapat bercak kemerahan yaitu antigen virus AI. Hal ini disebabkan karena virus influenza lebih menyukai bereplikasi pada saluran pencernaan dan menyebabkan tingginya titer virus pada feses (Horimoto dan Kawaoka, 2001). Kombinasi antara adanya reseptor sel terhadap antigen virus AI dan banyaknya enzim proteolitik memungkinkan efisiensi replikasi virus influenza pada organ usus dan proventrikulus (Slemons dan Easterday, 1998; Gambaryan et al., 2006). Banyaknya enzim proteolitik pada saluran pencernaan mengaktifkan pemotongan post translasi dari HA0 menjadi HA1 dan HA2 (Gurten dan Klenk, 1997). Pembelahan protein HA ini akan menyebabkan efisiensi replikasi virus AI pada usus.

Antigen juga terdeteksi pada organ paru-paru dan trakhea, karena virus AI memiliki

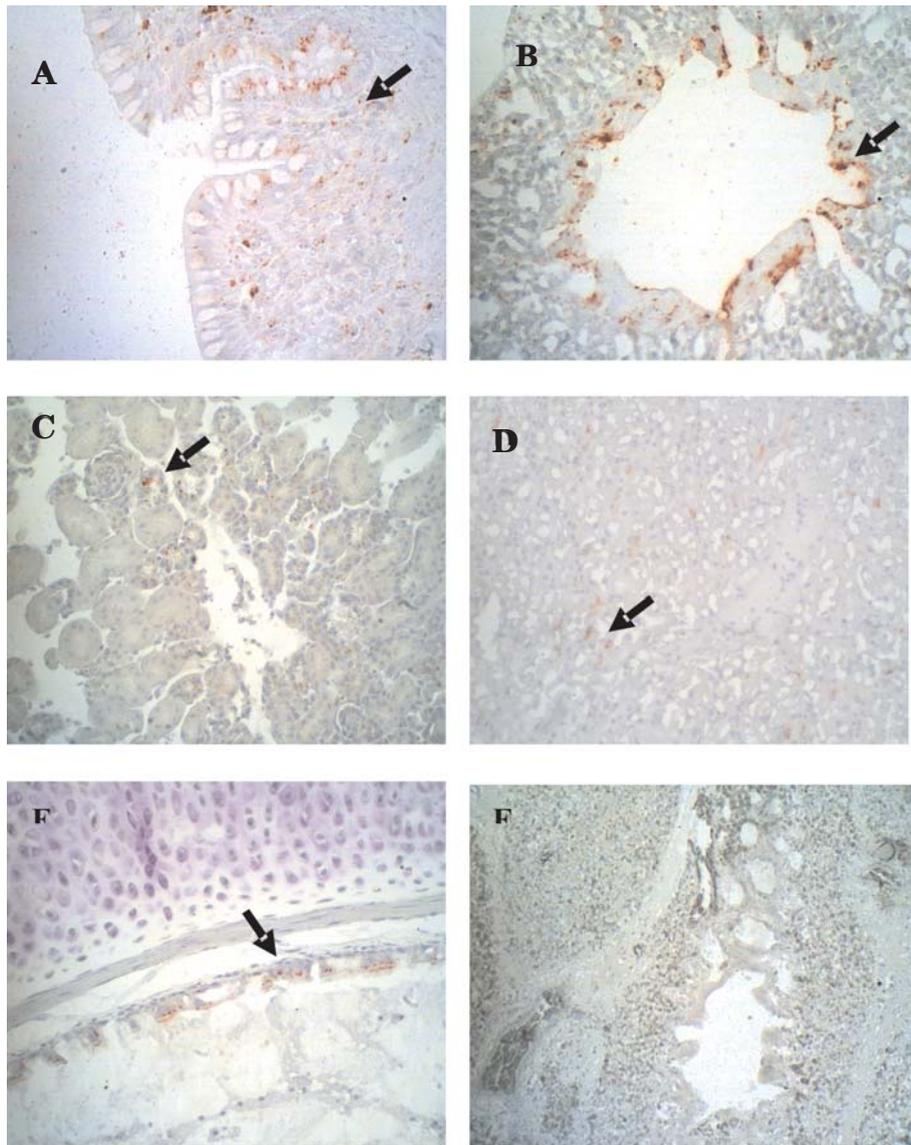
kecenderungan berkembangbiak pada sel epitel bersilia di saluran pernafasan. Organ saluran pernafasan merupakan sasaran utama virus AI, sel-sel epitel dari saluran pernafasan rentan terhadap infeksi virus. Reseptor virus adalah penentu *tropism* (respon organisme terhadap stimulus luar). Pada infeksi AI, tempat ikatan protein virus diperlukan untuk ikatan ke galaktosa mengikat asam sialik pada permukaan sel-sel inang (Weis et al., 1988). Virus yang masuk melalui inhalasi akan menembus mukosa saluran pernafasan dan melekat pada reseptor galaktosa yang ada pada saluran pernafasan dilanjutkan dengan proses endositosis dan fusi virus. Pada saat proses fusi, genom virus dilepaskan ke sitoplasma sel terinfeksi selanjutnya genom akan bermigrasi ke nukleus. Pada nukleus inilah terjadi transkripsi dan replikasi virus (Cross et al., 2001). Virus AI yang menginfeksi sel-sel epitel pernafasan akan bereplikasi dalam waktu berjam-jam dan memproduksi sejumlah virion (Behrens dan Stoll, 2006).

Antigen virus AI jarang ditemukan pada hati, ginjal, dan jantung kemungkinan karena infeksi virus AI masih pada tahap awal sehingga belum menyebar ke organ viseral lainnya. Antigen dapat dideteksi pada otak, jantung, paru-paru, pankreas dan ginjal dan diduga kuat virus HPAI menyerang saluran pernafasan untuk kemudian bereplikasi di sini dan menyebar ke semua organ viseral (Mo et al., 1997)

Virus AI yang terdeteksi pada beberapa organ DOC dalam penelitian ini sejalan dengan laporan Brown et al., (1992), bahwa antigen HPAI dapat dideteksi pada organ otak, jantung, ginjal, terutama menempati area vaskuler yaitu pada epitel endotel pembuluh darah. Hooper et al., (1995) juga menunjukkan bahwa virus HPAI dapat divisualisasikan pada kulit jengger, otak, jantung, paru-paru, otot skeletal, ginjal, limpa dan ovarium. Lebih lanjut Perkins dan Swayne (2003) melaporkan bahwa antigen HPAI dapat dijumpai pada otak, pankreas, limpa, kelenjar adrenal, dan ovarium.

Tabel 1. Titer antibodi terhadap virus AI H5N1

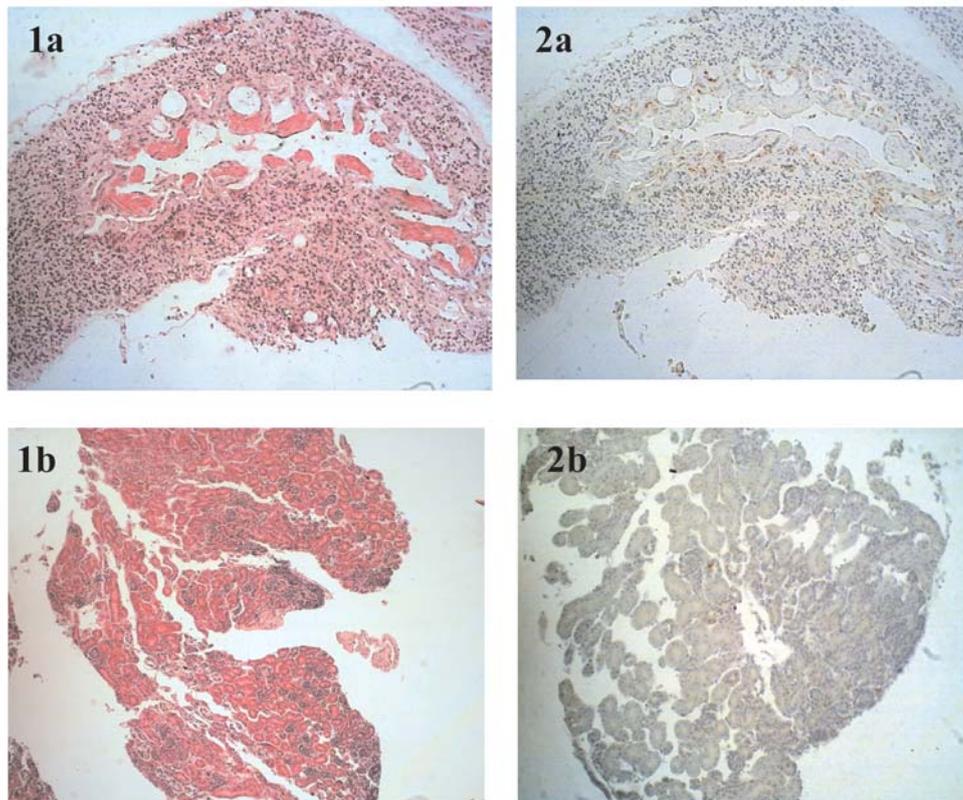
Jenis unggas	Jumlah sampel	Titer antibodi terhadap virus AI H5N1 dengan uji HI (log 2)										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DOC <i>layer</i>	84 ekor	6	9	15	11	12	12	10	7	2	-	-
DOC <i>broiler</i>	156 ekor	22	19	23	29	16	22	14	8	-	2	1
Total	240 ekor	28	28	38	40	28	34	24	15	2	2	1



Gambar 1. Keberadaan antigen virus AI H5N1 pada berbagai organ DOC; A. Pada sel epitel mukosa usus. B. Pada alveoli paru-paru. C. Pada sel tubulus ginjal. D. Pada sel-sel hati. E. Pada sel epitel trakea. F. Kontrol negatif pada paru-paru (tidak ditemukan adanya antigen).

Mo *et al.* (1997) berpendapat bahwa peran sistem kardiovaskular sangat besar dalam perjalanan penyakit AI. Antigen yang berlokasi di area vaskuler tersebut menimbulkan kondisi *iskemia* yang berlanjut pada *infark* vaskular yang secara klinis dapat dijumpai pada ayam yang mengalami sianosis pada jengger dan pial serta gangguan sirkulasi lainnya (Swayne dan Suarez, 2003).

Pelacakan antigen virus AI H5N1 pada DOC dengan metode pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal ini yang memiliki nilai diagnostik tinggi, karena antibodi bereaksi dengan protein hemaglutinin (HA) dari virus AI H5N1. Antibodi monoklonal memberikan hasil yang lebih spesifik dibandingkan dengan antibodi poliklonal karena antibodi monoklonal hanya bereaksi terhadap



Gambar 2. Perbandingan pewarnaan HE (1a dan 2a) dengan pewarnaan imunohistokimia (1b dan 2b) pada organ yang sama. Pada gambar 1a dan 2a terlihat adanya infiltrasi limfosit dan nekrosis pada jaringan yang terdeteksi antigen AI.

satu epitop dalam struktur antigen sehingga mampu mengenali suatu antigen virus dengan tingkat kekhasan yang tinggi (Astawa, 2007).

Perubahan Patologis Jaringan

Pada penelitian ini juga diamati perubahan patologis jaringan organ DOC dan terlihat adanya infiltrasi limfosit dan nekrosis. Perbandingan antara hasil pewarnaan hematoksilin eosin dan pewarnaan imunohistokimia (Gambar 2) terlihat bahwa pada jaringan yang banyak ditemukan antigen virus AI juga mengalami infiltrasi limfosit dan nekrosis.

Hal ini terjadi karena virus bereplikasi pada sel sehingga menyebabkan degenerasi dan kematian sel (Cheville, 2006). Menurut Mo *et al.*, (1997), antigen dalam jumlah tinggi terlihat mengelilingi area yang mengalami nekrosis tetapi relatif sedikit pada pusat nekrosis. Suarez *et al.* (1998) juga membuktikan bahwa kapiler pembuluh darah mengalami hipertropi dan

berisi masa protein serta sel radang. Fenomena ini menimbulkan hambatan suplai oksigen sehingga jaringan mengalami hipoksia yang berakibat nekrosis.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa DOC telah terinfeksi oleh virus AI dengan gejala subklinis dan berpotensi sebagai salah satu penyebab cepatnya penyebaran AI di Indonesia, sehingga perlu diwaspadai pendistribusiannya ke daerah yang masih bebas AI.

SARAN

Perlu dibuat kebijakan baru terkait dengan aturan distribusi DOC dari daerah endemis AI ke daerah yang masih bebas AI agar penyebaran AI di Indonesia tidak meluas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Departemen Pertanian yang telah memberikan beasiswa, Kepala Balai Besar Karantina Pertanian Soekarno Hatta beserta staf serta seluruh staf Lab. Patologi FKH IPB yang telah memberikan fasilitas serta semua pihak yang telah membantu penulis dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Astawa NM, Winaya IBO, Agustini LP, Hartaningsih N. 2007. Immunological detection of avian influenza virus in infected ducks by monoclonal antibodies against AIV-H5N1. *Microbiology Indonesia* 119-124
- Akoso BT. 2006. *Waspada Flu Burung Penyakit Menular Pada Hewan dan Manusia*. Yogyakarta. Penerbit Kanisius.
- Behrens G, Stoll M. 2006. Pathogenesis and immunology. <http://www.influenza-report.com/ir/pathogen.htm> (10 Juni 2008)
- Brown CC, Olander HJ, Senne DA. 1992. A pathogenesis study of highly pathogenic avian influenza virus H5N2 in chickens, using immunohistochemistry. *J Comp Path.* 107: 341-348
- Cheville NF, 2006. *Introduction to Veterinary Pathology*. 3rd ed. Blackwell Publishing, USA.
- Cross KJ, Wharton SA, Shekel JJ, Wiley DC, Steinhauer DA. 2001. Studies on Influenza hemagglutinin fusion peptide mutants generated by reverse genetics. *EMBO J* 20: 4432-4442
- Easterday BC, Hinshaw VS, Halvorson DA. 1997. Influenza. Dalam *Disease of Poultry*. 10th ed. Iowa State University Press Ames, Iowa, USA.
- [FAO] Food and Agricultural Organization. 2006. Epidemiology of Avian Influenza. <http://www.fao.org/avianflu/en/clinical.html> (16 Agustus 2008).
- [FAO] Food and Agricultural Organization. 2008. Understanding avian influenza. <http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/en/health/disease/> [20 Agustus 2008]
- Gambaryan A, Tuzikov A, Pazynina G, Bovin N, Balish A, Klimov A. 2006. Evolution of receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. *Virology* 344: 432-438
- Gurten W, Klennk HD. 1997. Understanding Influenza Virus Pathogenicity. *Trends Microbiol* 7:99-100
- Hooper PT, Russell GW, Selleck PW, Stanislawek WL. 1995. Observation on the relationship in chickens between the virulence of some avian influenza viruses and their pathogenicity for various organs. *Avian Dis.* 39: 458-464
- Horimoto T, Kawaoka J. 2001. Pandemic Threat Expose by AI A Viruses. *Clin Microbiol* 14 : 129-149
- Mo IP, Brugh M, Fletcher OJ, Rowland GN, Swayne DE. 1997. Comparative pathology of chicken experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenic. *Avian Dis.* 41 : 125-136
- Naruepol P, Chongmas A, Porntip P, Praisorn P. 2006. Isolation of avian influenza virus A subtype H5N1 from internal contents (albumen and allantoic fluid) of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs and oviduct during a natural outbreak.
- OIE. 2005. Highly Pathogenic Avian Influenza. *Manual of Standard diagnostic test and vaccine*. Pp. 1-16
- Perkins LE, Swayne DE. 2003. Pathogenicity of a Hongkong-origin H5N1 avian influenza virus in four Passerine species and budgerigars. *Vet. Pathol.* 40: 14-24. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;1081():171-3.
- Slemons MD, Esterday BC. 1998. Virus Replication in the Digestive Tract of . Duck Expose by Aerosol to Tye A Influenza. *Avian Dis* 22 :367-377
- Suarez DL, Purdue ML, Cox N, Rowe T, Bender C, Huang J, Swayne DE. 1998. Comparison of highly virulent H5N1 influenza a viruses isolated from humans and chicken from Hongkong. *J Virol* 72: 1-19.
- Swayne DE, Suarez DL. 2003. Biology of Avian Influenza Especially the Change of Low Pathogenicity Virus to High Pathogenicity. *Proc. Latin American Poultry Congress*. Oct 7, 2003
- Tizard, I.R., 2009. *Veterinary Immunology*. 8th Ed. Saunders Elsevier. St.Louis, Missouri. Pp. 215.
- Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC. 1988. Structure of The Avian Virus Haemagglutinin Complexed with its receptor, Sialic Acid. *Nature* 333:426-431. <http://amedeo.com/lit.php?=3374584>.
- Wibawan, W.T. 2006. Makalah Seminar Jurusan Jitu Atasi AI. <http://www.konsekuensiinfeksi.ai.subklinik.htm>. (5 September 2006)