

UJI PATOGENESIS, PATOGENISITAS DAN IMUNOGENESITAS DUA VIRUS INFECTIOUS LARYNGO TRACHEITIS ISOLAT LAPANG

RISA INDRIANI, HELMY HAMID, R.M. ABDUL ADJID dan MUHARAM SAEPULOH

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

ABSTRACT

Patogenicity and Immunogenicity Testing of Two Local Isolat of ILT Virus, BGR-6 and BKS-3

Two local isolat of ILT virus, BGR-6 and BKS-3, were studied further for their patogenicity and immunogenicity to see possibility for the use as vaccine. The two isolat were first grow on CAM of embryonated egg derived from chicken of SPF in passages of, then virus content was defined. Using poined dose, the two isolat were then infected to experimental chicken of SPF in isolator cages. Clinic syndromes, pathological anatomic lesions, and immunological respon were then observed. A group of SPF chicken was not infected by ILT virus as control. Results showed that the two isolates caused clinical signs with ITPI score 0,05 (BGR-6) and 0,03 (BKS-3). Both isolates caused lesion on infected chicken that was identified by pathological anatomic (PA) observation with ptominent lesion, i.e. haemorrhagic in conjunctiva, larynx, and thicken of airsac. Descriptively no different on degree of lesion caused by both isolates. Serological test of serum using an indirect ELISA showed that both isolates stimulate immunological system of chicken. Chicken infected with BGR-6, antibody titre indicated by optical density (OD) value, arise on day 7 (OD= 0,29), and then increased gradually with the top on day 42 (OD= 0,90) post infection. While chicken infected with BKS-3, antibody titre arise on day 14 (OD= 0,23), and then increased gradually with the top on day 28 (OD= 0,40) post infection. From this study it seem that BGR-6 isolates had higher patogenicity and immunogenicity rather than BKS-3 isolate.

Key words: Infectious Laryngotracheitis (ILT), BGR-6 and BKS-3 isolates, vaccine, chicken

PENDAHULUAN

Infectious Laryngotracheitis (ILT) adalah penyakit pernafasan yang bersifat akut dan sangat menular pada unggas (HANSON dan BAGUST, 1991), disebabkan oleh virus Herpes (BAGUST *et al.*, 1995). Serangan penyakit ini dapat menyebabkan gangguan pernafasan berat yang disertai muntah darah, kematian, penurunan berat badan serta penurunan produksi (HUGHEST *et al.*, 1987). Kasus ILT di Indonesia pertama kali dilaporkan menyerang ayam ras petelur berumur 20 minggu pada sebuah peternakan ayam di wilayah Bogor dengan tingkat kematian 3% (PARTADIREDA *et al.*, 1982). Sementara itu, kasus ILT pada ayam buras di kabupaten Bekasi, Jawa Barat pernah juga dilaporkan oleh GILCHRIST (1992). Selanjutnya berdasarkan hasil studi serologik di Jawa Barat telah pula diperoleh sebaran reaktor antibodi terhadap virus ILT pada ayam yang belum divaksinasi yaitu pada ayam ras mencapai 73-92,5% (MANGUNWIRYO *et al.*, 1995; WIYONO *et al.*, 1996). Kemudian di Kabupaten Bogor dan Bekasi masih ditemukan kasus ILT pada peternakan ayam pullet petelur yang belum divaksinasi (HELMY *et al.*, 2001), sample dari kasus ILT tersebut telah berhasil di isolasi oleh Balitvet. Dua isolat virus ILT lapang BGR-6 dan BKS-3 selanjutnya dilakukan uji patogenesis, patogenisitas dan imunogenisitas. Dari sifat-sifat ini

maka dapat diketahui dan diseleksi untuk kemungkinan dapat di pgunakan sebagai seed virus vaksin ILT isolat lapang.

MATERI DAN METODE

Virus ILT isolat lapang

Virus ILT yang digunakan adalah dua isolat virus ILT lapang yang telah diisolasi dan diidentifikasi yaitu, BGR 6 dan BKS 3. Isolat-isolat virus ILT lapang tersebut di lintaskan dan diperbanyak pada *Chorio Allantoic Membrane* (CAM) telur embrio tertunas ayam *Spesific Patogen Free* (SPF). Kandungan virus yang telah diperbanyak diukur dengan cara titrasi. Titrasi virus dilakukan pada CAM telur ayam SPF dalam kondisi steril. Cara titrasi mengikuti OIE (1996). Perhitungan kandungan virus dengan titrasi mengikuti cara REED dan MUNENCH (1938) dengan satuan kandungan virus dalam EID₅₀.

Hewan percobaan

Jenis hewan percobaan yang digunakan untuk uji infeksi dalam rangka mengetahui patogenesis, patogenitas dan imunogenisitas isolat adalah ayam SPF.

Ayam ini dipelihara pada kandang isolator selama percobaan berlangsung.

Infeksi hewan percobaan

Kelompok hewan percobaan dibagi ke dalam 3 kelompok yaitu kelompok 1 (isolat BGR-6), kelompok II (isolat BKS-3), dan kelompok III (kelompok negatif). Setiap kelompok terdiri dari 40 ekor ayam SPF umur 4 minggu. Masing-masing kelompok ayam tersebut diinfeksi dengan isolat virus ILT dengan kandungan virus 10^3 EID₅₀ per ekor melalui intranasal dan intratrakhea. Sedangkan kelompok negatif, ayam diinfeksi dengan cairan tanpa kandungan virus ILT. Pengamatan dilakukan pada hari ke 1, ke-4, ke 7, ke 9, ke 14, ke 21, dan ke 28 pasca infeksi masing-masing terhadap gejala klinis, perubahan patologi-anatomi, dan serologi. Untuk pemeriksaan patologi-anatomi, setiap kali pengamatan 4 ekor ayam diambil untuk bedah bangkai. Sedangkan untuk uji serologi dilakukan pengambilan serum darah sebanyak 10 sampel dari setiap kali pengamatan yang kemudian dilakukan serologi dengan *enzyme linked immunororbent assay* (ELISA).

Pemeriksaan klinis

Ayam percobaan diamati gejala klinis terhadap adanya gangguan pernafasan yang kemudian diberi nilai (skor) menurut GUY *et al.* (1990) yaitu, normal = 0, gangguan pernafasaan = 1, kematian = 2.

Pemeriksaan patologi dan histopatologis organ

Sampel berupa organ bagian saluran pernafasan trachea dan paru-paru serta organ lainnya yang berasal dari ayam yang diduga teresang virus ILT. Organ-organ tersebut dipotong-potong, lalu difiksasi selama 18 jam dalam larutan *Cornoy's*. Dehidrasi dilakukan dengan menggunakan konsentrasi alkohol bertingkat dan alkohol absolut. Selanjutnya dilakukan proses *clearing* dengan larutan xylol. Impregnasi dan *embedding* dilakukan dengan menggunakan mesin *Embedding Tissue-Tek II*. Jaringan dipotong setebal 5 µm dan diwarnai secara manual dengan larutan *Mayer's haematoxyline-eosin*. Selanjutnya potongan organ tersebut diamati di bawah mikroskop cahaya untuk melihat perubahan histopatologi dan diberi skor menurut GUY *et al.* (1990).

Pengamatan serologi

Darah hewan percobaan yang dikoleksi secara berkala diperiksa serumnya terhadap adanya antibodi virus ILT menggunakan *enzyme linked immunororbent assay* (ELISA) (INDRIANI *et al.*, 2002).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji patogenesis, patogenitas dan imunogenisitas virus ILT isolat lapang, masing-masing isolat BGR-6 dan BKS-3 dimulai dengan perlintasan dan perbanyakan virus tersebut pada CAM telur embrio tertunas ayam SPF sebanyak 5 kali berturut-turut sehingga diperoleh isolat virus ILT P5. Pada lintasan ke

Tabel 1. Hasil pengamatan klinis isolat virus ILT lapang pada ayam percobaan

Hari Kelompok	1	2	3	4	5	6	7	8	Total pengamatan	Nilai	Total nilai	ITPI
BGR-6												
Normal	37	34	35	35	31	30	31	28	261	0	0	0,05
Sakit	3	2	1	1	1	2	1	0	11	1	11	
Mati	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	
BKS-3												
Normal	39	35	34	34	31	31	32	28	264	0	0	0,03
Sakit	1	1	2	2	1	1	0	0	8	1	8	
Mati	0	0		0	0	0	0	0	0	2	0	
Kontrol												
Normal	40	36	36	36	32	32	32	28	272	0	0	0
Sakit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
Mati	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	

ITPI (*intratracheal patogenicity indices*) menurut GUY *et al.* (1990) dengan rumus:
$$\frac{\text{Total nilai sakit} + \text{total nilai kematian}}{\text{Total pengamatan}}$$

Tabel 2. Hasil pengamatan patologi anatomi (PA) ayam percobaan pasca infeksi olat virus ILT lapang

Isolat	Aspek lesi (PA)	Proporsi (jumlah+/jumlah total) ayam yang memperlihatkan lesi (hari pasca infeksi)						
		1	4	7	9	14	21	28
BGR-6	konjungtiva	1/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	laryng	3/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
	trachea	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	4/4	4/4
	sinus	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	konsolidasi							
	fokal pada paru	1/4	1/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	penebalan airsac	1/4	1/4	2/4	1/4	1/4	1/4	2/4
BKS-3	konjungtiva	1/4	2/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	laryng	4/4	3/4	4/4	4/4	2/4	2/4	3/4
	trachea	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	2/4	2/4
	sinus	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	konsolidasi							
	fokal pada paru	2/4	2/4	1/4	0/4	0/4	2/4	1/4
	penebalan airsac	2/4	1/4	2/4	1/4	1/4	1/4	2/4
Kontrol	konjungtiva	0/4	1/4	0/4	1/4	0/4	0/4	1/4
	laryng	0/4	1/4	1/4	0/4	0/4	1/4	0/4
	trachea	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
	sinus	0/4	0/4	1/4	1/4	0/4	0/4	1/4
	konsolidasi							
	fokal pada paru	0/4	0/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
	penebalan airsac	1/4	1/4	2/4	1/4	1/4	1/4	1/4

lima (P5) kandungan virus diukur. Hasil yang diperoleh memperlihatkan kandungan virus untuk BGR-6 adalah $10^6/0,1$ ml, sementara untuk isolat BKS-3 adalah $10^5/0,1$ ml.

Hasil pengamatan klinis pada ayam percobaan yang diinfeksi dan kontrol selama 8 hari pengamatan (GUY, *et al.*, 1990) dapat dilihat pada Tabel 1. Dari TABEL TERSEBUT terlihat bahwa kedua isolat memiliki nilai ITPI kurang dari 1 serta tidak menyebabkan kematian pada hewan percobaan (0%). Dari hasil pengamatan yang dilakukan juga terlihat bahwa tidak semua hewan percobaan memperlihatkan gejala klinis. Gejala klinis yang terlihat dapat dikatakan sangat ringan. Ini menunjukkan bahwa kedua isolat ini BGR-6 dan BKS-3 memiliki tingkat patogenisitas yang sangat rendah secara klinis.

Pada pemeriksaan patologi anatomi dari 4 ekor ayam yang diambil secara berkala selama 7 kali pengamatan (hari 1 sampai dengan hari ke 28) memperlihatkan bahwa aspek patologi anatomi dari kedua isolat tidak begitu berbeda, kedua isolat mengakibatkan perdarahan konjungtiva, laryng, trachea dan penebalan air sac (Tabel 2). Perubahan patologi secara makroskopis sering terlihat berupa sedikit

hemoraghis pada laryng pada beberapa ayam dari kelompok diinfeksi. Hampir pada semua trachea tidak terlihat perubahan yang spesifik. Pada beberapa kasus ditemukan adanya sereus exudate pada lumen trachea. Perubahan ini tidak menunjukkan adanya perbedaan yang jelas di antara waktu pengamatan. Beberapa kasus menunjukkan adanya perubahan pada paru berupa *focal konsolidasi*, sedangkan pada organ lainnya tidak terlihat adanya perubahan. Tidak ditemukan perubahan yang spesifik pada organ limfoid seperti limpa dan bursa fabrisius.

Perubahan histopatologi pada organ trachea dan laryng pasca infeksi isolat virus ILT lapang pada kelompok 1 dan 2, serta kelompok kontrol (3) terlihat Tabel 3.

Data tersebut memperlihatkan perubahan secara histopatologi pada trachea dan laryng yang berada pada nilai 0 dan 2, yang menunjukkan tidak terjadinya perubahan kearah ILT. Sedangkan menurut GUY *et al.* (1990) nilai kerusakan histopatologi pada trachea dan laryng lebih dari 2, menunjukkan kerusakan oleh virus ILT atau ILT positif. Dari pengamatan ini terlihat bahwa isolat virus ILT lapang tidak menunjukkan adanya

Tabel 3. Rataan perubahan mikroskopis (histopatologi) pada organ trakhea dan laryng pasca infeksi (n = 4)

Isolat	Waktu pengamatan (hari pasca infeksi)						
	1	4	7	9	14	21	28
BGR-6							
trakhea	0,5	0,75	0,75	1,25	1,25	0,5	0,50
laryng	1,25	0,75	0,75	1,25	1,25	1,75	1,5
BKS-3							
trakhea	0,25	0,75	0,25	0,75	0,75	0,75	0,25
laryng	0,75	1	0,25	0,75	0,75	1,5	1
Kontrol							
trachea	0	0,25	0	0	0,50	0	0
laryng	0	0,25	0	0	0,50	0,50	0,25

Kriteria mikroskopis scoring lesi trachea dan laryng yang di perlihatkan pada ayam terinfeksi virus ILT (GUY *et al.*, 1990)

0 = Normal

1 = Perubahan minimal : mucosa sedikit menebal disebabkan oleh infiltrasi sel lymphosit. Mucous gland normal, epitel pada umumnya normal, tidak terdapat focal sintisia epitel dan intranucleous inclusion bodies.

2 = Perubahan sedang: Mucous menebal yang disebabkan deh infiltrasi sel radang, pada umumnya epitelia dalam keadaan normal, sedikit perdarahan.

kerusakan pada trachea dan laryng yang disebabkan oleh virus ILT yang telah diatenuasi.

Perubahan Histopatologi pada organ lain, seperti paru, terlihat adanya respon imunologi pada BALT (Bronchial Asossiate Lymfhoid Tissue), tidak terlihat perbedaan respon ini berdasarkan lamanya waktu pengamatan. Dengan kata lain semua potongan paru menunjukkan respon BALT positif, sejak minggu pertama sampai dengan akhir pengamatan. Epitel bronchus dalam keadaan normal, tidak ditemukan adanya inclusion bodies. Pada beberapa potongan paru kadang-kadang juga terlihat adanya muco purulent exudat pada lumen bronchus. Adanya respon positif dari BALT, adalah merupakan perubahan yang disebabkan oleh reaksi imunopatologi akibat adanya reaksi dari BALT tersebut terhadap antigen dari isolat yang diberikan. Perubahan ini bukan merupakan kerusakan akibat virus ILT. Pada sinus, tidak ditemukan adanya perubahan sejak minggu pertama sampai akhir pengamatan. Conjunctiva pada beberapa sample ditemukan, hal ini juga pernah ditemukan oleh beberapa peneliti terdahulu yang merupakan reaksi lokal dari pemberian isolat dalam hal ini melalui intra ocular.

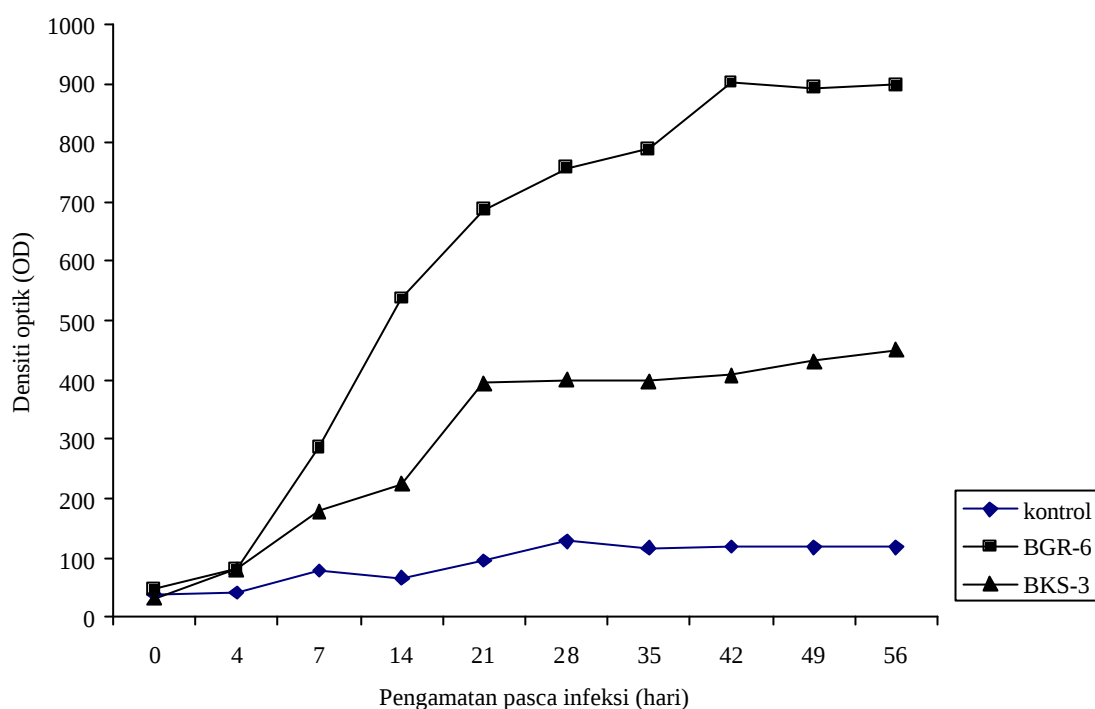
Lymfhoid organ, seperti limpa dan bursa, selama masa pengamatan tidak ditemukan kelainan spesifik. Organ lymfhoid dalam batas-batas normal. Perubahan diatas menunjukkan hewan percobaan yang digunakan dalam keadaan sehat, tidak terlihat adanya perubahan-perubahan kearah immunosupresif.

Hasil pemeriksaan serologi dengan uji ELISA guna mengetahui daya imunogenisitas isolat terlihat bahwa, kedua isolat sama-sama memiliki daya rangsang imunologis pada ayam yang diinfeksi (Gambar 1).

Respon imunologis ayam yang diinfeksi diekspresikan dalam nilai densitas optik. Pada ayam yang diinfeksi dengan isolat BGR-6, respon antibodi, mulai tampak naik pada hari ke 7 (OD = 0,29), kemudian meningkat terus dan mencapai puncaknya pada hari ke 42 (OD = 0,90). Sementara ayam yang diinfeksi dengan BKS-3 respon antibodi mulai nampak pada hari ke 14 (OD = 0,23) kemudian meningkat dan mencapai puncaknya pada hari ke 28 (OD = 0,40). Pola respon imunologis ayam yang diinfeksi dengan isolat virus ILT BGR-6 dan BKS-3 tampak serupa, namun tingkat daya rangsanganya tampaknya berbeda. Isolat virus ILT BGR-6 tampaknya memiliki daya rangsang imunogenisitas yang lebih baik dari isolat BKS-3.

KESIMPULAN DAN SARAN

Isolat BGR-6 tampaknya memiliki daya patogenisitas serta imunogenisitas yang lebih tinggi daripada isolat BKS-3. Penelitian lebih lanjut diperlukan apakah daya imunogenesitas yang dimiliki oleh isolat virus ILT lapang ini mampu menahan infeksi virus yang lebih ganas, serta kemampuannya dalam mengakibatkan penyakit pada ayam lainnya setelah virus tersebut berada di alam dalam waktu lebih dari 5 – 10 siklusnya.



Gambar 1. Respon serologis ayam SPF percobaan terhadap infeksi isolat virus ILT lapang

DAFTAR PUSTAKA

- BAGUST, T.J., R.C. JONES, and J.S. GUY. 2000. Avian infectious laryngotracheitis. *Rev sci.tech. Off.int.Epiz.* 19 (2), 483 – 492.
- GUY, J.S., H.J. BARNES, dan L.M. MORGAN. 1990. Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: Comparison of modified-live vaccine viruses and North Caroline field isolates. *Avian Dis.* 34:106-113
- GILCHRIST, P. 1992. *Report of suspected oscular form of infectious laryngotracheitis (ILT) in Bekasi.* Report for Balitvet Bogor
- HELMY, H., M. SAEPULLOH, RISA INDRIANI dan DARMINTO. 2001. Deteksi Infectious Laryngotracheitis (ILT) secara Patologik. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan.* pp 700 – 707
- HANSON, L.E. dan T.J. BAGUST. 1991. Laryngotracheitis. *Dalam: Calnek, B.W. et al. (Eds). Diseases of Poultry.* 9th editions. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. p. 485-495
- HUGHES, C.S., R.C. JONES, R.M. GASKELL, F.T.W. JORDAN dan J.M. BRADBURY. 1987. Demonstration in live chickens of the carrier state in infectious laryngotracheitis virus from latency infected carrier birds. *Res. Vet. Sci.* 42:407-410
- INDRIANI .R, R.M.A. ADJID, H. HAMID dan DARMINTO. 2002. Pengembangan Teknik ELISA untuk mendeteksi adanya antibodi terhadap virus ILT dalam serum ayam. *JITV 7 (.2):* 130 – 137
- MANGUNWIRYO, H., DARMINTO dan ZULKIFLI. 1995. Survei serologik terhadap infectious laryngotracheitis (ILT) pada ayam buras dan ras di Jawa Barat. *Dalam: Prosiding Seminar Nasional Teknologi Veteriner Untuk Meningkatkan Kesehatan Hewan Dan Pengamanan Bahan Pangan Asal Ternak.* Cisarua, Bogor 22-24 Maret 1994. Balai Penelitian Veteriner, Bogor. pp.140-147
- MANUAL OF STANDARDS FOR DIAGNOSTIC TEST and VACCINE. 2000. Avian Infectious Laryngotracheitis, OIE, pp: 549-554
- PARTADIREJIA, M., R.D. SOEDJOEDONO dan S. HARDJOSWORO. 1982. Kasus infectious laryngotracheitis di daerah Bogor, (Isolasi dan identifikasi virus dengan cara pewarnaan). *Proceedings Seminar Penelitian Peternakan.* Puslitbangnak. pp. 522-525
- REED AND MUENCH. 1938. A simple methode of estimating fifty per cent end-point. *Am. J. Hyg.* 27, 493-497
- WIYONO, A., MUHARAM S., ANTONIUS S., dan DARMINTO, 1996. Sebaran titer antibodi infectious laryngotracheitis (ILT) pada ayam ras dan buras di Kabupaten Cianjur, Tangerang dan Karawang. *Dalam: Prosiding Temu Ilmiah Nasional Bidang Veteriner, Bogor 12-13 Maret 1996.* Balai Penelitian Veteriner, Bogor. pp 88-95.