

Isolasi chicken infectious anemia virus (CIAV) dan reovirus dari ayam kerdil

Enuh Raharjo Jusa¹, M. Partadiredja², RD. Soejoedono² dan S.B. Siregar¹

¹Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunung Sindur, Bogor 16340

²Bagian Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, FKH-IPB

Abstrak

Pada awal tahun 1997, terjadi kasus pada ayam ras pedaging (broiler) umur di bawah 4 minggu. Kekeerdilan tersebut terjadi di peternakan komersial besar maupun yang kecil. Ayam-ayam itu menunjukkan gejala kekeerdilan, dengan berat badan kurang dari 400 gram pada umur 4-5 minggu, dibandingkan dengan ayam normal yang mencapai berat badan 1000 gram. Gejala patologi yang terlihat yaitu darah encer, terlihat anemia berat, pembengkakan hati serta terlihat garis keabu-abuan terbatas, bursa atrophy dan dindingnya translucent, dan limpa mengecil. Gejala tersebut menunjukkan adanya infeksi *chicken infectious anemia virus* (CIAV). Untuk mengetahui lebih lanjut penyebab kekeerdilan, dilakukan isolasi dengan sasaran yaitu chicken infectious anemia virus (CIAV) dan reovirus dari ayam kerdil yang didapat dari peternakan komersial. Di bawah ini diuraikan cara isolasi virus tersebut di atas dari organ hati, bursa dan limpa ayam kerdil dengan uji *fluorescent antibody* (FAT) dan *indirect peroxidase monolayer assay* (IPMA).

Kata kunci : Ayam kerdil, CIAV, Reovirus, FAT, IPMA.

Pendahuluan

Penyakit anemia pertama kali ditemukan oleh Yuasa (1979) dan kemudian di negara lain berhasil diisolasi CIA virus di Jerman, Swedia, Inggris, Canada dan USA. Nama penyakitnya berkembang dari Blue wing disease (BWD), Chicken anemia syndrome (CAS), hemorrhagic syndrome, chicken anemia agent (CAA), anemia dermatitis syndrome (ADS), chicken anemia virus (CIA) (Mc Nulty, 1997). CIA merupakan penyakit yang sangat menular pada ayam dengan gejala ayam pucat, kenaikan berat badan terhambat dan darah encer. Perubahan pasca mati hati membengkak dan kelihatan bercak-bercak, atrofi kelenjar thymus

dan sumsum tulang, perdarahan di bawah kulit dan urat daging. Angka kesakitan dan kematian dipengaruhi oleh virulensi galur CIA virus antara lain galur TK-5803 (Goryo *et al*, 1989) lebih ganas dari yang ditemukan oleh Yuasa dan Imai, induk semang dan keadaan lingkungan. Angka kesakitan dan kematian akan lebih menonjol bila ayam tertular CIA virus bersama-sama penyakit Marek, IBD, Reovirus, Reticuloendotheliosis virus (REV) dan adenovirus (Goodwin, 1996).

Bahan dan Metoda

Sampel dan sel jaringan

Ayam kerdil didapat dari 5 peternakan ayam komersial di sekitar

Bogor, Tangerang dan Bekasi (BOTABEK). setelah sampai di BPMSOH, sampel berupa hati, bursa dan limpa dari masing-masing ayam dikumpulkan. Sel jaringan yang digunakan yaitu T-lymphoblastoid cell line MDCC-MSB-1 cell (Courtesy Intervet, Hollands) dan sel ginjal ayam yang dibuat dari telur bertunas spesifik patogen free (SPF). Phosphat buffer saline (PBS) pH 7,2 dan antibiotik (gentamycine dan fungizone/tissue culture grade (Sigma Co. USA) untuk pelarut organ. Medium penumbuh sel yaitu RPMI-16340 mengandung 10% tryptose phosphate broth, 10% calf serum, 1,12% Sodium bicarbonat dan antibiotik.

Antisera (hyperimmune sera)

Antisera positif dan negatif terhadap CIAV dari Flockscreen, Guildhay, UK; Marek's virus, infectious bursal disease (IBD) virus dan Reovirus berasal dari ayam SPF yang diinjeksi dengan masing-masing virus tersebut.

Perlakuan terhadap sampel

Hati, limfa dan bursa fabrisius ayam yang sama disatukan, dihancurkan dengan homogeniser, pengenceran 1 : 10 dilakukan menggunakan PBS pH 7,2. Hasil pengenceran ditambah gentamycin dan fungizone sebagai antimikroba.

Sentrifus 2000 g selama 15 menit. Supernatan dipisahkan dan dimasukkan ke dalam tabung steril, kemudian diperlakukan dengan penambahan chloroform. Diinkubasikan pada water-bath 70°C selama 5 menit. Sentrifus kembali pada 2000 g selama 15 menit, kemudian supernatan difilter menggunakan kertas filter 0.22 μm .

Untuk isolasi CIAV, dinokulasikan pada *T-cell lymphoblastoid cell lines* MDCC-MSB-1 dengan konsentrasi sel 2.5×10^5 ml pada microplate dengan menggunakan media RPMI-16340 yang ditambahkan 10% tryptose phosphate broth (TPB), 5% calf serum, 1,12% sodium bicarbonate, fungizone dan antibiotik. Kemudian sel tersebut diinkubasikan pada suhu 39°C dengan 5% CO₂. Sedangkan untuk reovirus digunakan sel ginjal embrio ayam dengan media yang sama seperti CIAV, dan diinkubasikan pada suhu 37°C dengan 5% CO₂. Pengamatan pada hari ke-2 atau ke-3, dilakukan pasase ulang dengan cara yang sama. Pasase dilakukan sampai 15 kali.

Uji Fluorescent antibody (FAT)

Pada pasase ketiga sel MDCC-MSB-1 yang diinfeksi dengan masing-masing isolat, pada hari kedua dilakukan panen sel dan dicuci dengan PBS dua kali. Sel tersebut dimasukkan pada slide glas dan diratakan, kemudian difiksasi dengan acetone dan digunakan sebagai sumber antigen. Antisera positif dan negatif terhadap CIAV Marek's virus, IBD virus dan Reovirus secara terpisah dimasukkan pada slide glas. Inkubasikan selama 30 menit pada suhu 37°C. Setelah dicuci dengan PBS 3 kali, masukkan anti chicken IgG rabbit serum yang telah dilabel dengan *fluorescent isothiocyanate* (Cappel, North Carolina) dan inkubasikan pada suhu 37°C selama 30 menit. Cuci lagi dengan PBS 3 kali. Cara yang sama dilakukan pula dengan menggunakan sel ginjal embrio ayam untuk uji reovirus. Pembacaan hasil dengan menggunakan mikroskop fluorescen, yang positif menunjukkan reaksi fluorescen dan negatif tidak ada perubahan.

Tabel 1. Asal sampel dan jenis organ dari ayam kerdil untuk isolasi virus dengan menggunakan sel MDCC-MSB-1 ginjal embrio ayam

No	Asal sampel	Jenis Organ	Hasil pasase ke-3					Interpretasi	
			CIAV		Cross neutralisasi			CIAV **	Reo
			FA	IPMA	IBD	Marek's	Reo		
1.	Komersial	H,B,L	+	-	-	-	+	-	+
2.	Komersial	H,B,L	++	+	-	-	-	++	-
3.	Komersial	H,B,L	+	-	-	-	-	-	-
4.	Komersial	H,B,L	++	+	-	-	-	++	-
5.	Komersial	H,B,L	+	-	-	-	+	-	+

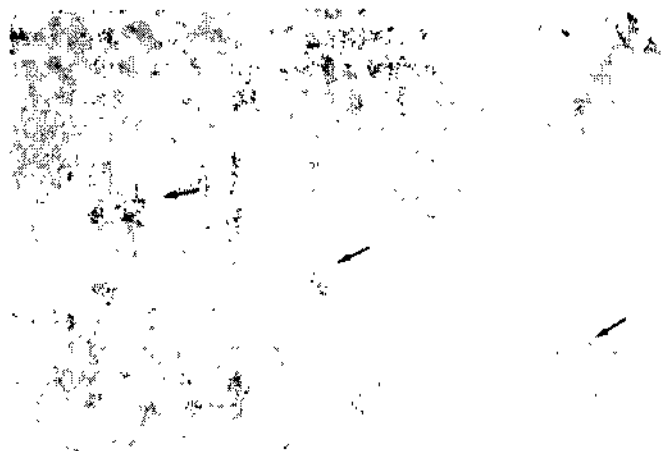
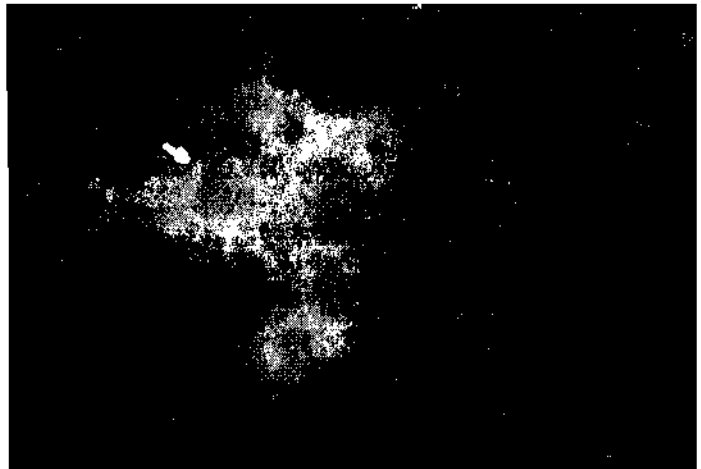
Keterangan :

* H = hati; B = bursa; L = limpa

** Pada pasase ke-10 sampai ke-15, masih menunjukkan positif CIAV untuk contoh no. 2 dan 4, sedangkan untuk no. 1, 3 dan 5 negatif CIAV dengan menggunakan sel MDCC-MSB-1 dan untuk reovirus menggunakan sel ginjal embrio ayam

Gambar 1.

Deteksi antigen CIAV pada sel MDCC-MSB-1 dengan uji FAT pada pasase ke-3. Arah panah menunjukkan positif



Gambar 2.

Deteksi antigen CIAV pada sel MDCC-MSB-1 dengan uji IPMA pada pasase ke-3. Arah panah menunjukkan positif

Uji Indirect Peroxidase Monolayer Assay (IPMA)

Sebagai sumber antigen berasal dari sel MDCC-MSB-1 yang dibiakkan pada 24 lubang semi mikroplat pada pasase ke-3 dari masing-masing isolat. Dua hari kemudian sel difiksasi dengan 35% acetone dalam PBS yang mengandung 2% bovine serum albumin selama 10 menit pada suhu kamar dan keringkan. Masukkan antisera positif dan negatif terhadap CIAV, Marek's virus, IBD virus dan Reovirus, inkubasikan selama 60 menit pada suhu 37°C. Sel dicuci dengan PBS-T (PBS yang ditambahkan 0.05% Tween-20). Anti chicken IgG rabbit antibodi label dengan horseradish peroxidase (1:2000, Cappel, North Carolina) dimasukkan pada semi mikroplat dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 60 menit. Dicuci 3 kali dengan PBS-T dan dimasukkan substrate yang mengandung 20 mg 3-amino-9-ethylcarbazole yang dilarutkan dalam 6 ml *N,N*-dimethyl-formamide (Aldrich Chemical, Co, USA) dalam 100 ml 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.0 dan 0.4 ml dari 3% hydrogen peroxidase pada masing-masing lubang pada semi mikroplate. Cara yang sama dilakukan pula dengan menggunakan sel ginjal embrio ayam untuk uji reovirus. Pembacaan hasil dengan melihat di bawah mikroskop, yang menunjukkan reaksi terlihat warna merah coklat dan negatif tidak terjadi perubahan warna.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi chicken anemia virus dari organ (hati, limpa dan bursa) ayam kerdil dapat dilihat dalam Tabel 1. Hasil pasase ketiga dilakukan uji fluorescent antibodi (FAT) dan indirect peroxidase monolayer assay (IPMA) dengan menggunakan serum kontrol positif dan negatif terhadap CIAV dan Reovirus. Sampel

yang diuji menunjukkan hasil positif terhadap CIAV dan uji FA maupun IPMA (Gambar 1 dan 2). Untuk kemurnian isolasi, dilakukan uji netralisasi silang dengan antisera Reovirus, Marek's dan IBD virus. Hasil menunjukkan meskipun dilakukan pasase sampai ke 15, pada peternakan ayam komersial nomor 2 dan 4 masih bereaksi dengan antisera CIAV pada uji FAT dan IPMA. Sedangkan sampel yang perlakuannya dengan menggunakan sel ginjal embrio ayam, menunjukkan reaksi positif dengan FAT dan IPMA pada peternakan ayam komersial nomor 1 dan 5 (Tabel 1).

Beberapa peneliti menyatakan bahwa kejadian yang berhubungan dengan kasus ayam kerdil disebabkan oleh beberapa faktor yaitu adanya infeksi CIAV (Mc Nulty, 1997), infeksi reovirus (Goodwin, 1996), kegagalan vaksinasi newcastle disease (De Boer *et al.*, 1994), infeksi IBD (Rosenberger dan Cloud, 1989) dan infeksi Marek (Jeurissen dan De Boer, 1993). Dari hasil penelitian ini, ayam-ayam kerdil yang terjadi di Indonesia salah satu penyebab utama disebabkan oleh chicken infectious anemia virus (CIAV) dan reovirus.

Pencegahan penyakit ini dengan mempertahankan titer antibodi yang tinggi terhadap reovirus, IBD, Marek pada breeder (parent stock) sekitar umur 22 minggu (sebelum masa bertelur) akan mengurangi kasus kekerdilan. Cara yang paling efektif adalah melakukan program vaksinasi dengan vaksin CIAV, baik virus yang sudah dilemahkan maupun vaksin inaktif pada breeder sebelum masa bertelur, agar keturunannya memiliki antibodi maternal yang dapat melindunginya dari serangan CIAV (Mc Nulty, 1997). Kontrol CIAV, dilakukan dengan program deteksi antibodi pada breeder terhadap CIAV sebelum fase bertelur, mengurangi penyebab yang memperburuk penyakit (seperti IBD, Marek) dan stress penanganan yang kurang baik.

Isolation of chicken infectious anemia (CIAV) and reovirus from retarded growth chicken

Abstract

In early 1997, Cases of retarded growth had been reported in broiler under 4 weeks old. The retarded growth occurred in big and small commercial flock chicken. Chicken with retarded growth have body weight less than 400 g at 4-5 weeks fold. Pathological signs showed that blood is more watery, heavy anemia liver was swollen with grayish line, bursal atrophy, the outer bursal wall appears translucent, and thymic atrophy. Based on these signs, it is suspected that the disease was chicken infectious anemia (CIA) (Bulow *et al.*, 1997; Goryo *et al.*, 1987; Rosenberger *et al.*, 1989; Taniguchi *et al.*, 1982 and 1983). Isolation of CIAV an Reovirus suggested that both were the causal agent of retarded growth in commercial chicken farm. The virus was isolated from liver, bursa and thymus of the suspected chicken and tested by fluorescent antibody test (FAT) and indirect peroxidase monolayer assay (IPMA).

Key words : Retarded growth of chicken, CIAV, Reovirus, FAT, IPMA

Daftar Pustaka

- Bulow, V.V., and A.K. Schat. 1997. Chicken infectious anemia (CIA). In : *Disease of Poultry Tenth Edition* (Ed. Calneck B.W.): 739-756.
- De Boer, G.F., D.J. Van Roozelaar, R.J. Moormann, S.H.M. Jeurissen, J.C. Van Den Wijngaard, F. Hilbink, and G. Koch. 1994. Interaction between chicken anemia virus and live Newcastle disease vaccine. *Avian Pathology*, 23: 263-275.
- Goodwin, M.A. 1996. Viruses that cause immunosuppression in chickens. *Poultry digest* : 10-20.
- Goryo, M., Y. Shibata, T. Suwa, T. Umemura and C. Itakura. 1987. Outbreak of anemia associated with chicken anemia agent in young chicks. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49: 867-873.
- Goryo, M., T. Suwa, T. Umemura, C. Itakura and S. Yamashiro. 1989. Histopathology of chicks inoculated with chicken anemia agent (MSB-1-TK5803 strain). *Avian Pathol.* 18: 73-89.
- Jeurissen, S.H.M. and G.F. De Boer. 1993. Chicken anemia virus influence the pathogenesis of Marek's disease in experimental infections depending on the dose of Marek's disease virus. *Veterinary Quarterly*, 14: 81-84.
- Mc Nulty, M.S. 1997. Chicken Anemia Virus-aglimse of future. *British Poultry Science.* 38: 7-13.
- Rosenberger, J.K., and S.S. Cloud. 1989. The effect of age, route of exposure, and coinfection with infections bursal disease virus on the protogenicity and transmissibility of chicken anemia agent (CAA). *Avian Disease.* 33: 753-759.

- Taniguchi, T.N., N. Yuasa, M. Maeda and T. Horiuchi. 1982. Hematophotological changes in dead and moribund chicks induced by chicken anemia agent. *Natl. Inst. Animal Health Quarterly (Jpn)* **22** : 61-69.
- Taniguchi, T.N.m N. Yuasa, M. Maeda and T. Horiuchi. 1983. Chronological observations on hemato-pathological changes in chicks inoculated with chicken anemia agent. *Natl. Inst. Animal Health Quarterly (Jpn)* **23** : 1-12.
- Yuasa, N., T. Taniguchi and I. Yoshida. 1979. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. *Avian Disease*. **23** : 366-385.