

DETEKSI ANTIGEN VIRUS *INFECTIOUS BRONCHITIS* DENGAN TEKNIK IMUNOHISTOKIMIWI PADA AYAM PEDAGING YANG DIINFEKSI DENGAN ISOLAT IB I-269 ATAU DISUNTIK DENGAN VAKSIN HIDUP H-120

RINI DAMAYANTI dan DARMINTO

Balai Penelitian Veteriner
Jalan RE Martadinata 30, Kotak Pos 151, Bogor 16114, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 27 Nopember 2001)

ABSTRACT

DAMAYANTI, R and DARMINTO. 2001. The detection of *infectious bronchitis* viral antigen by means of immunohistochemical technique in broiler chicken infected with I-269 IB isolate or injected with H-120 live vaccine. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6(4): 239-246.

A study was carried out to detect the antigen of infectious bronchitis virus (IBV) in broiler chicken by means of immunohistochemical technique. A total of 150 - fourteen days old broiler chicken were divided into three groups i.e. 50 chicken were infected with an IB isolate of I-269, 50 chicken were injected with H-120 live vaccine, and 50 chicken served as un-treated control. Clinical signs and gross pathological changes were observed. Each of five chicken of each group were necropsied at 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 21, 28, and 35 day(s) post infection/vaccination. The antigen could be detected at one day through 35 days post vaccination/infection. In the vaccinated group, histopathological lesions and the detected antigen were minimal. In contrast, the infected chicken showed varied histopathological lesion in accordance with the numerous antigens. The antigen were observed in the lymphocytes/macrophages in the trachea, lungs and kidney, and in the epithelium of trachea, alveoli, bronchioles and tubular cytoplasm of the kidney of both vaccinated and infected groups. In the infected group, antigen was also detected in the lymphocytes and macrophages of the affected organs.

Key words: *Infectious bronchitis*, broiler chicken, I-269 IB isolate, immunohistochemistry

ABSTRAK

DAMAYANTI, R dan DARMINTO. 2001. Deteksi antigen *infectious bronchitis* dengan teknik imunohistokimiawi pada ayam pedaging yang diberi isolat IB I-269 atau disuntik dengan vaksin hidup H-120. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6(4): 239-246

Teknik imunohistokimiawi telah digunakan untuk mendeteksi antigen IB pada ayam pedaging yang berumur 14 hari yang diinfeksi secara buatan dengan isolat IB lokal I-269 dan divaksin dengan galur H-120. Sebanyak 150 ekor ayam pedaging dibagi atas tiga grup yaitu : 50 ekor diinfeksi dengan isolat I-269, 50 ekor diberi vaksin hidup H-120, dan 50 ekor digunakan sebagai hewan kontrol. Gejala klinis dan pascamati diamati dan nekropsis dilakukan masing-masing 5 ekor per grup pada hari 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 21, 28, dan 35 pascainfeksi/vaksinasi. Antigen dapat dideteksi pada 1 hingga 35 hari pascainfeksi/vaksinasi. Pada grup ayam yang divaksinasi, lesi histopatologi tergolong minimal, demikian pula jumlah antigen yang dideteksi. Sedangkan pada grup yang diinfeksi, lesi histopatologi bervariasi dengan jumlah antigen lebih dominan. Pada ayam yang divaksin/diinfeksi antigen ini dapat dideteksi pada epitel trakhea, alveoli, bronchioles, dan sitoplasma sel-sel tubulus ginjal. Selain itu, antigen dapat pula ditemukan pada ayam yang diinfeksi, yaitu pada sel limfosit dan makrofag di daerah lesi.

Kata kunci: *Infectious bronchitis*, ayam pedaging, isolat IB I-269, teknik imunohistokimiawi

PENDAHULUAN

Secara ekonomis penyakit *infectious bronchitis* (IB) yang disebabkan oleh virus *corona* banyak menimbulkan kerugian karena angka kematian pada ayam muda tergolong tinggi, yang disertai dengan gejala berupa sesak napas, bersin dan mengorok (HOFSTAD, 1984). Pada ayam petelur penyakit IB dapat menurunkan produksi dan kualitas telur (CHUBB, 1988). Selain itu penyakit IB bersifat akut dan sangat menular terutama terserang galur virus yang tergolong

nephropathogenic dapat menimbulkan kematian pada ayam pedaging maupun petelur (BROWN *et al.*, 1987 dan KING dan CAVANAGH, 1991).

Di Indonesia penyakit IB telah tersebar di berbagai daerah dan tingkat prevalensi di pulau Jawa mencapai 60% (DARMINTO *et al.*, 1988). Pada saat ini diagnosis penyakit IB di lapangan lebih banyak ditinjau dari aspek klinis, patologis dan angka morbiditas serta mortalitasnya dan diperkuat dengan isolasi serta identifikasi virus pada telur ayam berembrio yang memerlukan pasase berulang (*blind passages*) sehingga

kasus IB di lapangan tidak dapat diketahui dengan segera. Mengingat hal tersebut maka suatu metode diagnosis yang lebih cepat dan lebih akurat masih diperlukan.

Bagian diagnostik laboratorium Patologi Balitvet sering menerima spesimen berupa ayam/organ ayam yang diduga terserang IB yang diperiksa dengan metode konvensional berupa pewarnaan hematoksilin dan eosin (H&E), maka konfirmasi diagnosis tidak dapat ditentukan secara akurat, sehingga hasil penelitian ini akan dapat diterapkan untuk mendeteksi antigen IB pada sejumlah ayam pedaging yang terinfeksi dengan virus IB isolat lapang I-269 (DARMINTO, 1995). Pada prinsipnya antigen dapat dideteksi pada jaringan organ ayam yang terinfeksi IB pada waktu yang relatif singkat (HSU *et al.*, 1981). Teknik serupa telah berhasil dipakai untuk mendeteksi antigen pada ayam yang terinfeksi dengan Gumboro (JONSSON dan ENGSTROM, 1986), Newcastle Disease (ND) (HAMID *et al.*, 1990) dan Infectious Laryngo-tracheitis (ILT) (GUY *et al.*, 1992).

MATERI DAN METODE

Inokulum

Inokulum yang digunakan adalah isolat IB : I-269 (DARMINTO, 1995). Stok virus diencerkan secara *serial dilution* dari 10^{-1} hingga 10^{-7} sebelum disuntikkan pada 5 telur ayam tertunas SPF (specific pathogen free) yang berumur 9 hingga 11 hari. Pertumbuhan virus pada telur ini diamati dan dikalkulasi sehingga kandungan virus mencapai 10^5 EID50/100 μ l stok. Stok virus dengan dosis $10^{5,0}$ EID50 tersebut diinokulasikan pada telur berembrio tertunas yang berumur 9 hari. Setelah diinkubasikan 48 jam pada suhu 37°C, telur tersebut didinginkan pada suhu 4°C selama semalam. Kemudian cairan alantois dapat dipanen dan disimpan pada suhu -70°C dalam kemasan masing-masing 0,5 ml. Dosis inokulum yang diberikan pada ayam pedaging yang berumur 14 hari yaitu $10^{5,0}$ EID50 per 100 μ l secara intra-nasal sesuai dengan prosedur dari CHEN *et al.* (1996). Inokulum berupa vaksin diberikan dengan cara mengencerkan stok vaksin H-120 (Bioral, Rhone Merieux) dalam 5 ml larutan PBS steril (untuk 100 dosis). Larutan tersebut diambil 1 ml (untuk 200 dosis) dan ditambah dengan 5 ml larutan PBS steril sehingga menjadi 6 ml. Masing-masing ayam memperoleh inokulum sebanyak 1 dosis, yakni 30 μ l (1 tetes) secara intra-nasal.

Infeksi buatan

Pada studi ini dipakai sebanyak 150 ekor ayam pedaging umur 1 hari. Ayam-ayam tersebut diberi pakan dan minum secukupnya. Pada umur 14 hari, ayam-ayam tersebut dinyatakan bebas dari infeksi IB dengan

menggunakan uji serologi Hemaglutinasi Inhibisi (HI) menurut metode dari ALEXANDER dan CHITTLE (1977). Ayam-ayam tersebut dibagi atas tiga grup perlakuan dan ditempatkan pada kandang-kandang yang terpisah: 50 ekor diberi inokulum isolat IB I-269, $10^{5,0}$ EID50 per 100 μ l per ekor secara intra-nasal, 50 ekor diberi vaksin hidup H-120 (Bioral, Rhone Merieux), 1 dosis, intra-nasal, dan 50 ekor dipakai sebagai hewan kontrol.

Gejala klinis diamati setiap hari, demikian pula kelainan pascamati dicatat pada saat nekropsi. Nekropsi dilakukan pada hari ke 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 21, 28, dan 35 setelah infeksi/vaksinasi, masing-masing 5 ekor per grup perlakuan.

Koleksi sampel organ

Sampel yang diambil berupa potongan organ trakhea, paru-paru dan ginjal, masing-masing berukuran 10 X 10 X 3 mm. Untuk uji histopatologi, sampel organ difiksasi dalam larutan buffer formalin 10%, sedangkan untuk pewarnaan imunohistokimiawi sampel difiksasi dalam larutan Bouin yang sudah dimodifikasi (JONSSON dan ENGSTROM, 1986). Organ dalam fiksasi Bouin tersebut disimpan pada suhu 4°C selama lebih kurang 24 jam sebelum diproses sebagai blok parafin sesuai metode standar.

Produksi antisera anti-IB pada kelinci

Sejumlah duabelas (12) ekor kelinci diimunisasi dengan vaksin IB inaktif galur Massachusetts 41 (M-41) yang mengandung ajuvant (Bronchivak, Vaksindo) sebanyak 2 dosis secara intra-muskular, 2 kali suntikan dengan interval 3 minggu. Dua minggu sesudahnya, diimunisasi 2 kali dengan vaksin hidup (galur H-120, Bioral, Rhone Merieux) masing-masing 500 dan 1000 dosis secara intra-vena dengan interval 4 minggu. Antisera dapat dipanen 10 hari kemudian setelah dicek titer antibodinya dengan uji Hemaglutinasi Inhibisi (HI). Antisera dianggap memenuhi syarat apabila titer antibodi menunjukkan 2^6 . Antisera ini akan digunakan sebagai *primary antibody* pada pewarnaan imunohistokimiawi. Metode yang dipakai untuk pembuatan antisera ini mengacu pada prosedur dari YAGYU dan OHTA (1987).

Pewarnaan hematoksilin dan eosin (HE)

Pada saat nekropsi potongan organ trakhea, paru-paru dan ginjal difiksasi dalam larutan *buffer neutral formalin* (BNF) 10%. Selanjutnya organ diblok dengan parafin dan diproses sesuai metode standard untuk pewarnaan HE. Derajat keparahan lesi dinyatakan dengan skoring sebagai berikut: - (tidak ada perubahan histopatologis yang signifikan), + (lesi ringan), ++ (lesi sedang), dan +++ (lesi parah). Penentuan skoring

tersebut tidak dapat diukur secara kuantitatif karena tergantung dari beberapa faktor sekaligus, yakni: jumlah (area) infiltrasi sel radang dan area yang abnormal (perdarahan, oedema, degenerasi, nekrosis, hiperplasia mukosa epitel dll). Kesimpulan diagnosis tentang derajat keparahan lesi ditentukan secara deskriptif-kualitatif berdasarkan pengamatan patologis terhadap lesi tersebut.

Pewarnaan dengan metode imunohistokimiawi

Dalam penelitian ini dipakai metode ikatan kompleks avidin-biotin peroksidase sesuai dengan prosedur dari HSU *et al.* (1981); JONSSON dan ENGSTROM (1986). Dengan teknik pewarnaan ini maka antigen yang diduga terdapat pada jaringan organ ayam yang terinfeksi IB dapat dideteksi. Aplikasi teknik ini memakai reagen yang dikemas dalam bentuk kit yang didapat secara komersial (ABC kit, Vector Lab. Inc., Burlingame, USA).

Sebelum dilakukan pewarnaan, maka kaca obyek yang berisi potongan organ direndam dalam larutan Borax 1% selama 10 menit untuk membilas warna kuning dari larutan Bouin. Teknik pewarnaan dengan metode ABC lalu diaplikasikan. Mula-mula kaca obyek yang sudah berisi potongan organ ayam diberi larutan 10% serum kambing normal selama 30 menit untuk menghilangkan *background* nonspesifik. Setelah melalui proses standarisasi untuk menentukan konsentrasi optimal, *primary antibody* (antiserum anti IB) dalam larutan bufer garam tinggi dengan konsentrasi 1:400 yang berisi 1% serum kambing normal diaplikasikan selama 60 menit. Kemudian, pada kaca obyek tersebut diberi *secondary antibody* yaitu serum IgG anti-kelinci yang sudah dilabel dengan biotin dengan pengenceran 1:200 selama 30 menit. Selanjutnya, larutan kompleks avidin biotin peroksidase ditetaskan pada kaca obyek dengan konsentrasi 1:100 selama 45 menit. Reaksi antigen-antibodi tersebut divisualisasikan dengan substrat 0,06% 3,3 di-aminobenzidin tetrahidroklorida (DAB) (Sigma Chem. St Louis, USA) yang dilarutkan dalam larutan 0,05M garam TRIS pH 7,6 dan 0,01% H₂O₂ selama 2-5 menit. Antigen akan berwarna coklat, sedangkan latar belakang jaringan organ tetap berwarna biru.

Kontrol spesifisitas dilakukan dengan cara: menghilangkan tahap pemberian *primary antibody*, *secondary antibody*, organ kontrol negatif (dari ayam *specific patogen-free*/SPF), organ kontrol positif (dari ayam terinfeksi IB yang berhasil diisolasi virusnya) dan pewarnaan hanya dengan substrat DAB. Kontrol ini dilakukan setiap kali pewarnaan dilakukan.

Pemeriksaan untuk mendeteksi antigen ini dilakukan dengan sebuah mikroskop dengan perbesaran obyektif X okular 10 X 20 (Olympus, BH-2, Japan). Jumlah sel yang berantigen per lapangan pandangan dinyatakan dengan membuat skoring sebagai berikut: - (tidak ada

antigen), + (5-10 sel berantigen/lapangan pandangan), ++ (10-20 sel berantigen/lapangan pandangan) dan +++ (lebih dari 20 sel berantigen/ lapangan pandangan), dengan pengulangan pengamatan masing-masing 5 kali.

HASIL

Pada penelitian ini tampak bahwa ayam-ayam dari grup yang divaksin dengan vaksin hidup galur H-120 dan grup kontrol keduanya tidak menimbulkan gejala klinis IB sampai akhir pengamatan. Sedangkan pada grup ayam yang diinfeksi dengan isolat I-269 tampak gejala klinis yang tidak menonjol, berupa depresi dan eksudat cair pada rongga hidung pada 3-14 hari pascainfeksi (PI) dan tidak ditemukan kematian hingga akhir masa pengamatan.

Secara mikroskopis, ayam kontrol tidak menunjukkan kelainan pada organ trakhea, paru-paru dan ginjal. Sedangkan ayam yang diberi vaksin hidup H-120 mempunyai lesi ringan berupa trakheitis non-supuratif pada 7 hari hingga 5 minggu PI dan bronkhopneumonia non-supuratif pada 3 dan 5 minggu PI (Tabel 1). Pada kelompok ayam yang diinfeksi dengan isolat I-269 secara histopatologis ditemukan trakheitis non-supuratif ringan/sedang pada 3 hari hingga 2 minggu PI, dan lesi menjadi parah mulai 3 hingga 5 minggu PI (Tabel 1). Selain itu, bronkho-pneumonia non-supuratif pada kelompok ayam ini dapat dideteksi pada 4 hari hingga 3 minggu PI dan lesi menjadi parah mulai 3 hingga 5 minggu PI (Tabel 1). Baik kelompok yang diberi vaksin maupun yang diinfeksi dengan isolat I-269 tidak menimbulkan kelainan histopatologis pada organ ginjal sampai akhir masa pengamatan.

Deteksi antigen dari organ-organ ayam pada ketiga kelompok perlakuan tersebut dilakukan untuk diagnosis dan uji patogenisitas isolat I-269. Hasil penelitian ini tertuang pada Tabel 2. Pada kelompok ayam yang berfungsi sebagai kontrol, antigen tidak dapat ditemukan selama masa pengamatan. Pada kelompok ayam yang diberi vaksin hidup H-120 dan isolat IB I-269, antigen dapat dideteksi pada ketiga organ mulai 1 hari sampai dengan 5 minggu PI, dengan skor seperti tertera pada Tabel 2.

Pada ayam yang divaksin dengan galur H-120, antigen IB dapat dideteksi pada sel-sel epitel lapisan mukosa trakhea. Gambar 1 menunjukkan antigen IB yang dideteksi pada organ trakhea dari kelompok ayam yang divaksinasi dengan H-120 pada 10 hari pascavaksinasi. Pada sebagian dari sel-sel epitel pada daerah mukosa terdapat antigen IB, terutama menginfiltrasi daerah sitoplasma, terlihat sebagai warna coklat tua dengan substrat DAB. Latar belakang dari sel-sel yang tidak mengandung antigen IB tetap berwarna biru.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan histopatologi pada ayam pedaging yang diinfeksi dengan isolat I-269, vaksin H-120 dan kontrol

Nomor urut pengambilan sampel	Kode perlakuan (n = 5)	Waktu pengambilan sampel ^{*)}	Derajat lesi HP		
			Trakheitis	Broncho-pneumonia	Nephritis
1	Kontrol K1 – K5	1 hari	-	-	-
	Vaksin A1 – A5		-	-	-
	Infeksi B1 – B5		-	-	-
2	Kontrol K1 – K5	2 hari	-	-	-
	Vaksin A1 – A5		-	-	-
	Infeksi B1 – B5		-	-	-
3	Kontrol K1 – K5	3 hari	-	-	-
	Vaksin A1 – A5		-	-	-
	Infeksi B1 – B5		+	-	-
4	Kontrol K1 – K5	4 hari	-	-	-
	Vaksin A1 – A5		-	-	-
	Infeksi B1 – B5		+	+	-
5	Kontrol K1 – K5	7 hari	-	-	-
	Vaksin A1 – A5		+	-	-
	Infeksi B1 – B5		+,++	-	-
6	Kontrol K1 – K5	10 hari	-	-	-
	Vaksin A1 – A5		+	-	-
	Infeksi B1 – B5		++	++	-
7	Kontrol K1 – K5	2 minggu	-	-	-
	Vaksin A1 – A5		+	-	-
	Infeksi B1 – B5		++	++	-
8	Kontrol K1 – K5	3 minggu	-	-	-
	Vaksin A1 – A5		+	-,+	-
	Infeksi B1 – B5		++,+++	++,+++	-
9	Kontrol K1 – K5	4 minggu	-	-	-
	Vaksin A1 – A5		+	-	-
	Infeksi B1 – B5		++,+++	++,+++	-
10	Kontrol K1 – K5	5 minggu	-	+	-
	Vaksin A1 – A5		+	-,+	-
	Infeksi B1 – B5		++,+++	++,+++	-

Keterangan:

K1-K5 : ayam kontrol
A1-A5 : ayam diberi vaksin H-120 pada umur 14 hari
B1-B5 : ayam diberi isolat I-269 pada umur 14 hari

- : tidak ada lesi

+

++ : lesi sedang

+++ : lesi parah

*) :hari/minggu PI

Gambar 1. Antigen IB (tanda panah) yang dideteksi pada organ trakhea dari kelompok ayam yang divaksin dengan galur H-120 pada 10 hari pasca vaksinasi. (Imunohistokimiawi, *Avidin Biotin Peroxidase Complex*, X 174)

Pada ayam dari kelompok yang diinfeksi dengan isolat IB I-269 ternyata kerusakan pada trakhea lebih parah dan antigen dapat dideteksi dalam jumlah yang lebih besar. Di sini lapisan mukosa dan sub-mukosa tampak menebal karena ada odema dan infiltrasi sel-sel limfosit dan makrofag. Antigen IB dapat ditemukan dalam sitoplasma dan hampir menempati seluruh epitel lapisan mukosa trakhea sehingga membentuk deretan sel-sel yang berwarna coklat tua dengan latar belakang di sekitarnya yang tetap berwarna biru.

Selain pada organ trakhea, antigen IB juga dapat ditemukan pada organ paru-paru khususnya di daerah epitel mukosa parabronkus (brokheolus tertier) dan secara individual tersebar pula pada epitel alveoli (Gambar 2). Pada gambar tersebut, antigen tampak berwarna coklat tua dan terkonsentrasi di sekitar lumen parabronkus dan beberapa sel alveoli yang terinfiltrasi dengan antigen. Antigen dapat dideteksi baik pada kelompok ayam yang diberi vaksin H-120 maupun isolat IB I-269 dengan jumlah antigen lebih banyak ditemukan pada kelompok yang diinfeksi dengan isolat I-269 (lihat Tabel 2).

Gambar 2. Antigen IB (tanda panah) pada epitel mukosa parabronkus (brokhirole tertier) dan alveoli pada ayam yang diinfeksi dengan isolat IB I-269, 2 minggu PI. (Imunohistokimiawi, *Avidin Biotin Peroxidase Complex*, X 191)

Meskipun pada semua kelompok ayam tidak ditemukan kelainan histopatologis pada ginjal namun ternyata antigen IB dapat dideteksi pada organ tersebut dengan kisaran antigen tergolong pada kriteria +, ++ dan +++ (lihat Tabel 2). Gambar 3 menunjukkan antigen yang berwarna coklat tua pada ayam yang diinfeksi dengan isolat IB I-269 dan menempati daerah sitoplasma dari sel tubulus ginjal, baik secara individual atau membentuk deretan menyerupai rantai.

Gambar 3. Antigen IB (tanda panah) pada ginjal ayam yang diinfeksi dengan isolat IB I-269, 2 minggu PI. (Imunohistokimiawi, *Avidin Biotin Peroxidase Complex*, X 139)

Tabel 2. Deteksi antigen IB secara imunohistokimiawi pada organ ayam pedaging yang diinfeksi dengan isolat I-269, vaksin H-120 dan kontrol

Nomor urut pengambilan sampel	Kode perlakuan (n = 5)	Waktu pengambilan sampel ^{*)}	Skor antigen		
			Trakhea	Paru-paru	Ginjal
1	Kontrol K1 – K5		-	-	-
	Vaksin A1 – A5	1 hari	+	+	-
	Infeksi B1 – B5		+	+	+
2	Kontrol K1 – K5		-	-	-
	Vaksin A1 – A5	2 hari	+	+	+
	Infeksi B1 – B5		++	++	++
3	Kontrol K1 – K5		-	-	-
	Vaksin A1 – A5	3 hari	+	+	+
	Infeksi B1 – B5		+	++	++
4	Kontrol K1 – K5		-	-	-
	Vaksin A1 – A5	4 hari	+	+	+
	Infeksi B1 – B5		+	++	++
5	Kontrol K1 – K5		-	-	-
	Vaksin A1 – A5	7 hari	+	+	+
	Infeksi B1 – B5		+	+	+
6	Kontrol K1 – K5		-	-	-
	Vaksin A1 – A5	10 hari	+	+	+
	Infeksi B1 – B5		+	+	++
7	Kontrol K1 – K5		-	-	-
	Vaksin A1 – A5	2 minggu	+	+	+
	Infeksi B1 – B5		+	++	++
8	Kontrol K1 – K5		-	-	-
	Vaksin A1 – A5	3 minggu	+	+	+
	Infeksi B1 – B5		++	++	+++
9	Kontrol K1 – K5		-	-	-
	Vaksin A1 – A5	4 minggu	+	+	+
	Infeksi B1 – B5		++	++	+++
10	Kontrol K1 – K5		-	-	-
	Vaksin A1 – A5	5 minggu	+	+	+
	Infeksi B1 – B5		+++	++	++

Keterangan:

K1-K5 : ayam kontrol

A1-A5 : ayam diberi vaksin H-120 pada umur 14 hari

B1-B5 : ayam diberi isolat I-269 pada umur 14 hari

*) : hari / minggu PI

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolat IB I-269 dapat menimbulkan gejala klinis dan patologis penyakit IB pada ayam pedaging berumur 14 hari, yaitu pada 1-35 hari pascainfeksi, meskipun derajat keparahan penyakitnya tidak sehebat kasus di lapangan. Perlu diketahui bahwa isolat I-269 ini tergolong ke dalam serotipe dengan sifat-sifat yang sangat menyerupai dengan galur Massachusetts 41 (M-41) (DARMINTO, 1995). Galur M-41 ini mempunyai sifat *nephropathogenic* karena sangat patogen terhadap organ ginjal (BUTCHER *et al.*, 1990). Isolat lokal I-269 yang dipakai dalam penelitian ini telah dipasase beberapa kali dalam kondisi laboratorium. Manifestasi penyakit di lapangan biasanya lebih ganas karena ayam diekspose dengan lingkungan alam yang sebenarnya, tidak di dalam kandang isolator yang sangat terjaga sanitasinya. Selain itu penyakit IB di lapangan dapat diperparah oleh infeksi sekunder yang menyertainya (BUTCHER *et al.*, 1990).

Pada kelompok ayam yang divaksin dengan galur H-120, gejala klinis dan patologisnya tidak muncul. Galur H-120 ini mempunyai sifat-sifat yang sangat dekat (*closely related*) dengan M-41 (KUSTER *et al.*, 1987). Galur virus yang dipakai untuk vaksin H-120 ini telah mengalami pasase tinggi sehingga patogenitasnya sudah jauh berkurang dari galur M-41 (CUNNINGHAM, 1975). Terlepas dari manifestasi klinis dan patologis yang ditimbulkan oleh isolat I-269 tersebut ternyata dengan metode pewarnaan imunohistokimiawi antigen IB dapat dideteksi pada berbagai organ jaringan dengan lokasi distribusi yang sangat spesifik. Pada trakhea antigen dapat dideteksi pada sitoplasma sel epitel di daerah mukosa dan pada sel makrofag yang menginfiltrasi daerah tersebut. Hasil ini sesuai dengan temuan dari JONSSON dan ENGSTROM (1986) dan BAGUST (1982) yang menggunakan strain M-41. Selain itu antigen IB juga ditemukan pada sitoplasma sel tubulus ginjal, sesuai dengan sifat isolat yang bersifat *nephropathogenic*. Dengan mikroskop elektron partikel virus M-41 dapat dideteksi pada sitoplasma sel tubulus ginjal (CHEN dan ITAKURA, 1996). Mereka juga menambahkan bahwa replikasi virus IB paling banyak ditemukan pada ginjal. Meskipun diduga kuat bahwa target organ dari virus IB adalah trakhea dan ginjal namun pada kasus IB yang parah virus dapat diisolasi dari trakhea, paru-paru, hati, limpa dan ginjal (CUMMING, 1967), bursa, *caecal tonsil* dan feses (ALEXANDER dan GOUGH, 1977). Khusus untuk ayam petelur jaringan predileksi virus yang utama adalah saluran pernapasan, reproduksi dan urogenital (JORDAN, 1972 dan CHUBB, 1988).

Pada penelitian ini kehadiran antigen tidak selalu disertai dengan respon selular, seperti halnya dilaporkan oleh OWEN *et al.* (1991). Di sinilah letak keunggulan

teknik imunohistokimiawi dimana antigen dapat dideteksi bahkan sebelum respon klinis dan patologisnya muncul. Pada kelompok ayam yang divaksin, antigen dapat dideteksi pada berbagai jaringan organ walaupun manifestasi penyakit tidak muncul. Sebagai pembanding, walaupun tidak disertai respon selular, teknik imunohistokimiawi ini juga mampu untuk mendeteksi distribusi antigen pada trakhea dan ginjal pada ayam yang diberi vaksin IB galur H-52 yang banyak dipakai dalam industri perunggasan (OWEN *et al.*, 1991). Bahkan hal ini justru dipakai untuk membedakan apakah antigen IB yang dideteksi berasal dari vaksin (tanpa respon selular) ataukah berasal dari infeksi (disertai lesi/respon selular). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa antigen dapat juga dideteksi pada daerah lesi pada kelompok ayam yang diinfeksi.

Teknik pewarnaan imunohistokimiawi pada jaringan ini telah diaplikasikan pada penelitian serupa untuk mendeteksi antigen pada infeksi viral pada unggas, seperti pada *Lymphoid Leukosis* (LL), *Newcastle Disease* (ND), *fowl pox*, *gumboro* dan *Infectious Laryngotracheitis* (ILT) (OWEN *et al.*, 1991). Keuntungan dari teknik ini antara lain: pewarnaan dapat dilakukan dengan cepat, tidak perlu memakai mikroskop fluoresen, hasil pewarnaan permanen, deteksi antigen dan lesi jaringan dapat dilihat pada preparat yang sama sehingga proses imuno-patogenesis dapat diketahui dengan jelas. Satu-satunya kendala adalah bahwa untuk mendeteksi antigen tertentu harus mempersiapkan *primary antibody* yang sesuai dengan antigen yang akan dideteksi. *Primary antibody* ini dapat diperoleh secara komersial, melalui kontak dengan peneliti lain dari berbagai negara ataupun disiapkan di laboratorium jauh sebelum pewarnaan dimulai.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dengan pewarnaan imunohistokimiawi antigen IB dapat dideteksi pada 1-35 hari pasca vaksinasi/infeksi. Pada ayam yang divaksin deteksi antigen tidak disertai lesi/reaksi selular yang signifikan sedangkan pada ayam yang diinfeksi deteksi antigen disertai dengan lesi histopatologis. Distribusi antigen pada kelompok ayam yang diinfeksi/divaksin meliputi epitel mukosa trakhea, alveoli, bronkheolus dan sitoplasma sel tubulus ginjal. Selain itu pada ayam diinfeksi antigen juga dapat ditemukan pada daerah lesi yaitu pada sel limfosit dan makrofag yang menginfiltrasi organ-organ tersebut di atas.

Metode pewarnaan imunohistokimiawi ini dapat dipakai untuk mengkonfirmasi diagnosis penyakit IB dengan cepat dan akurat pada sampel organ ayam yang diduga terserang IB. Walaupun demikian aplikasinya di laboratorium diagnostik perlu dipertimbangkan segi efisiensinya karena harga kit komersial yang relatif mahal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada para teknisi pada Kelompok Peneliti (Kelti) Patologi dan Kelti Virologi atas segala bantuan teknis selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- ALEXANDER, D.J. and N.J. CHETTLER. 1977. Procedure for the haemagglutination and haemagglutination inhibition tests for avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 6:9-17
- ALEXANDER, D.J. and R.E. GOUGH. 1977. Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. *Res. Vet. Sci.* 23:344
- BAGUST, T.J. 1982. Coronavirus of poultry. In: Advances In Veterinary Virology. Proceeding No. 60. p.441-445. The Post Graduate Committee In Veterinary Science. The University of Sydney.
- BROWN, T.P., J.R. GLISSON, G. ROSAKES, P. VILLEGAS, and R.B. DAVIS. 1987. Studies of avian urotheliasis associated with an infectious bronchitis virus. *Avian Diseases* 31:345-348
- BUTCHER, G.D., R.W. WINTERFIELD and D.P. SHAPIRO. 1990. Pathogenesis of H13 nephro-pathogenic infectious bronchitis virus. *Avian Diseases* 34:916-921
- CHEN, B.Y. and C. ITAKURA. 1996. Cytopathology of chick renal epithelial cells experimentally infected with avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 25:675-690
- CHEN, B.Y., S. HOSI, T. NUNOYA and C. ITAKURA. 1996. Histopathology and immunohistochemistry of renal lesion due to infectious bronchitis virus in chicks. *Avian Pathol.* 25:269-283
- CHUBB, R.C. 1988. The strategic defence of bird against infectious bronchitis nephritis. In: Poultry Disease Proceedings No. 112. The Asia/Pacific Poultry Health Conference. p.337-348. Surfers Paradise, Australia.
- CUMMING, R. B. 1967. Studies on Infectious Bronchitis nephrosis/nephritis (uraemia). PhD Thesis. The University of New England, Armidale, Australia.
- CUNNINGHAM, C.H. 1975. Immunity to avian infectious bronchitis. *International Symposium on immunity to infections of the respiratory system in man and animals.* London. Develop. Biol. Standard. 28:546-562
- DARMINTO. 1995. Diagnosis, epidemiology and control of two major avian viral respiratory diseases in Indonesia: Infectious bronchitis and Newcastle disease. PhD Thesis. Department of Biomedical and Tropical Veterinary Science. James Cook University of North Queensland. Australia.
- DARMINTO, P. YOUNG, P. YOUNG and P.W. DANIELS. 1988. Studies on avian infectious bronchitis in Indonesia: isolation of the virus and serological investigation. In: Poultry Disease, Proceedings 112. The Asia/Pacific Poultry Health Conference. p.581-591. Surfers Paradise, Australia.
- GUY, J. S. H. J. BARNES and L. G. SMITH. 1992. Rapid diagnosis of Infectious Laryngo-tracheitis using a monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure. *Avian Pathol* 21: 77-86
- HAMID, H., R.S.F. CAMPBELL and C. LAMICHANE. 1990. The Pathology of infection of chicken s with the lentogenic V 4 strain of Newcastle Disease virus. *Avian Pathol.* 19: 687-696
- HOFSTAD, M.S. 1984. Avian infectious bronchitis. In: Diseases of Poultry. 8th Edn. Eds. M.S. HOFSTAD, H.J. BARNERS, B.W. CALNEK, H.W. JR. JUDER. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA. p.429-443
- HSU, S.M., L. RAINE, and H. FANGER. 1981. The use of avidin-biotin peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *Am. J. Clin. Pathol.* 75:816-821.
- JONSSON, L.G.O. and B.E. ENGSTROM. 1986. Immunohistochemical detection of infectious bursal disease and infectious bronchitis viral antigens in fixed paraffin embedded chicken tissues. *Avian Pathol.* 15:385-393
- JORDAN, F. T. W. 1972. The epidemiology of disease of multiple aetiology: The avian respiratory disease complex. *Vet. Rec* 90: 556-562
- KING, D.J. and D. CAVANAGH. 1991. Infectious bronchitis. In: B.W. CALNEK, H.J. BARNES, C.W. BEARD, W.M. REID and H.W. YODER JR (Eds). *Diseases of Poultry.* 9th Ed. p.471-484. Ames, Iowa, State University Press.
- KUSTER, J.O., H.G.M. NIESTERS, N.M.C. BLUEMINK, P. LIYN, F.G. DAVELAAR, M.C. HORZINEK and B.A.M. VAN DER ZEIJST. 1987. Molecular epidemiology of infectious bronchitis in Netherlands. *J. Gen. Virol.* 68:343-352
- OWEN, R. L., B. S. COWEN, A. L. HATTEL, S. A. NAQI, and R.A. WILSON. 1991. Detection of viral antigen following exposure of one day old chicken to the Holland 52 strain of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 20:663-673
- YAGYU, K. and S. OHTA. 1987. Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay for the detection of infectious bronchitis virus antigens. *Japanese Journal of Veterinary Science* 49 (5): 757-763