

RESPONS KLINIS SAPI BALI YANG DIVAKSIN TERHADAP UJI TANTANG DENGAN BOVINE HERPES VIRUS-1 ISOLAT LOKAL

SUDARISMAN

Balai Penelitian Veteriner
Jalan R.E. Martadinata No. 30, P.O. Box 52, Bogor 16114, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 18 Oktober 2001)

ABSTRACT

SUDARISMAN. 2001. Clinical responses of vaccinated Bali cattle against challenge with a field isolate of Bovine Herpesvirus-1. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6 (3): 179-185.

The aim of this study is to investigate the post challenge clinical responses of Bali cattle vaccinated with an inactivated vaccine of a field isolate Bovine Herpesvirus-1 after being challenged with the same virus. Twenty eight Bali cattle were divided into two groups of ten animals, one of which was vaccinated with a single dose and the other one was vaccinated with a booster dose of vaccination, and the rest of the animals were remained untreated as a control group. One month after the last vaccination, a half number of animals in each group were challenged intravenously with 5×10^8 TCID₅₀ pathogenic strain of BHV-1 local isolate. Clinical signs were observed from day 0 to day 14 after challenge. These observed included body temperature, mucosal membrane changes of nostril, vagina and palpebrae, hyperlacrimation and hypersecretion of nose and eyes. General clinical changes and mucous membrane lesions of nostril were scored from 0 to 3. The results showed that the non-vaccinated animals: elevated temperature (up to 40.1°C), hyperlacrimation, nasal discharge and mucosal hyperaemia of nostril and vagina after challenge. The duration of illness ranged from 3 to 7 days. Symptoms appeared after an incubation periode of 3 days and disappeared after 5 days (day 9). These clinical symptoms didn't appear on the vaccinated animals with single or boosted vaccination. One month after vaccination, the antibody titre reached 2^{11} (2048) based on serum neutralisation test (SNT). These vaccinated animals showed good immune responses to BHV-1.

Key words: Clinical responses, inactivated vaccine, field isolate, BHV-1, Bali cattle.

ABSTRAK

SUDARISMAN. 2001. Respons klinis sapi Bali yang divaksin terhadap uji tantang dengan Bovine Herpesvirus-1 isolat lokal. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 6 (3): 179-185.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji kemungkinan adanya respons klinis dari sapi Bali yang divaksin dengan vaksin inaktif BHV-1 terhadap uji tantang dengan isolat lapangan BHV-1. Dalam percobaan ini digunakan 28 ekor sapi Bali yang dibagi menjadi tiga kelompok. Kelompok pertama divaksinasi tunggal (10 ekor), kelompok kedua divaksinasi boster (10 ekor) dan kelompok ketiga tidak divaksinasi (8 ekor) sebagai hewan kontrol. Satu bulan sesudah vaksinasi terakhir, separuh dari tiap kelompok hewan diuji tantang dengan menyuntikkan virus galur patogenik isolat lapangan BHV-1 dengan dosis 5×10^8 TCID₅₀ intravena. Gejala klinis diamati dari hari ke 0 hingga 30 hari pasca uji tantang. Penampilan gejala klinis yang diamati berupa kenaikan suhu badan, perubahan membran mukosa hidung, vagina dan kelopak mata serta sekresi berlebihan dari hidung dan mata. Kelainan klinis dan lesi mukosa hidng diskorsing dari 0 hingga 3. Hasil memperlihatkan bahwa kelompok hewan yang tidak divaksinasi, tetapi diuji tantang terjadi kenaikan suhu badan hingga 40,1° C, terjadi hiperlakrimasi, ingusan dan hiperemis pada mukosa hidung dan vagina. Waktu terjadinya gejala tersebut dimulai dari hari ke-3 hingga hari ke-7 pasca uji tantang. Gejala klinis terjadi sesudah masa inkubasi 3 hari dan menghilang setelah 5 hari terjadinya gejala klinis (hari ke-9). Perubahan ini tidak terlihat pada hewan baik yang divaksinasi tunggal maupun vaksinasi boster. Satu bulan sesudah vaksinasi titer antibodi mencapai 2^{11} (2048) yang diuji dengan uji serum netralisasi (SNT). Hewan-hewan yang divaksinasi memperlihatkan respons kekebalan yang baik terhadap BHV-1.

Kata kunci: Gejala klinis, vaksin inaktif, isolat lapangan, BHV-1, sapi Bali.

PENDAHULUAN

Virus BHV-1 (bovine herpesvirus type 1) pertama kali diisolasi pada tahun 1956 oleh Madin *et al.* (OIRSCHOT *et al.*, 1996), yang kemudian diatenuasi dan digunakan sebagai vaksin hidup (OIRSCHOT *et al.*, 1996). Sejak saat itu vaksin hidup dan vaksin mati

(*killed/inactivated vaccine*) terus diproduksi dan berkembang. Vaksin-vaksin ini dapat mencegah terjadinya gejala klinis penyakit yang disebabkan oleh virus BHV-1 yaitu *infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis* (IBR/IPV) dan kerugian ekonomi yang diakibatkan oleh penyakit ini. Penggunaan vaksin-vaksin di atas juga

dapat mengurangi terjadinya penyebaran virus serbagai akibat terjadinya infeksi (OIRSCHOT, 1996; POSPISIL *et al.*, 1996).

IBR merupakan penyakit viral akut dan sangat menular yang mengakibatkan menurunnya nafsu makan, kenaikan suhu badan yang dapat mencapai 41° C (GIBBS dan RWEYEMAMU, 1977) dan biasanya suhu meningkat pada hari ketiga ataupun keempat pasca infeksi buatan dan berakhir hingga hari ke-15 (HALLORAN *et al.*, 1991), sedangkan MC. KERCHER *et al.* (1970) menerangkan bila infeksi buatan melalui intra vena, demam terjadi pada hari kedua atau ketiga pasca inokulasi dan berlanjut hingga hari keenam. Secara umum, manifestasi penyakit ini, dapat berupa gangguan saluran pernapasan, konjungtifitis, vulvovaginitis, keguguran, balanoposteititis, meninggoencefalitis, gangguan saluran pencernaan dan infeksi sistemik yang bersifat fatal (KAHRS, 1977; SAXEGAARD, 1970).

Di Indonesia infeksi virus BHV-1 secara serologik telah dilaporkan oleh banyak peneliti (MARFIATININGSIH, 1982; NOOR *et al.*, 1983; SAROSA, 1985; WIYONO *et al.*, 1989; SUDARISMAN, 1992).

Seperti diketahui, hingga kini vaksin IBR/IPV dibagi menjadi dua kategori besar: *attenuated/modified live vaccine* (vaksin hidup) dan *inactivated/subunit vaccine* (vaksin mati). Vaksin mati mengandung galur BHV-1 yang dimatikan, sehingga tidak bersifat menularkan penyakit dan tidak berkembang/memperrbanyak diri pada inang. Vaksin ini akan menjadi lebih baik bila ditambahkan ke dalamnya adjuvant/ *ISCOM* (*immunostimulating complex*) untuk meningkatkan respons kekebalannya (ZUSCHEK dan CHOW, 1961; MATSUKO *et al.*, 1972; OIRSCHOT *et al.*, 1996). Galur virus untuk vaksin mati tidak membutuhkan atenuasi pada biakan sel dan dapat memperbanyak diri pada biakan sel, sehingga bila telah mencapai titer yang tinggi, segera diinaktifasi (dimatikan) dengan perlakuan penambahan bahan kimia seperti *alkylating agent*. Pemilihan adjuvant, bahan inaktifasi virus dan jumlah/titer antigen sangat berperan dan merupakan faktor kritis yang perlu diperhatikan untuk mendapatkan kualitas vaksin IBR/IPV yang baik (DUQUE *et al.*, 1989; KAASHOEK *et al.*, 1995). Tulisan ini dimaksudkan untuk memperlihatkan respons klinis sapi Bali yang divaksin dengan vaksin inaktif sesudah diuji tantang dengan isolat lapangan BHV-1.

MATERI DAN METODE

Hewan percobaan

Sapi Bali sebanyak 28 ekor digunakan untuk penelitian ini dan hewan tersebut dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan. Kelompok pertama terdiri atas 10 ekor, diberi perlakuan satu kali vaksinasi, kelompok

kedua terdiri atas 10 ekor, diberi perlakuan dua kali vaksinasi dan kelompok ketiga terdiri atas delapan ekor yang tidak diberi perlakuan sebagai kelompok kontrol. Keseluruhan hewan diambil darahnya untuk uji serologi sebelum diberi perlakuan untuk menentukan ada tidaknya titer antibodi terhadap virus BHV-1.

Vaksinasi

Vaksinasi dilakukan dengan vaksin inaktif buatan Balitvet yang dibuat dari bibit vaksin virus BHV-1 isolat lapangan yang telah diketahui sifat-sifatnya dan ditumbuhkembangkan pada sel lestari MDBK (*Madin Darby bovine kidney*) dengan medium DMEM (*Dulbecco's minimum essential medium*) dengan penambahan 2% FCS (*foetal calf serum*). Bahan inaktifasi yang digunakan adalah penambahan formalin hingga konsentrasi akhir menjadi 0,1% (37% formaldehida, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany) selama satu malam dalam keadaan dingin sambil diaduk dalam mixer. Lalu ditambahkan adjuvant dalam volume yang sama banyak dengan hasil inaktifasi tersebut. Adjuvant yang digunakan adalah *Freund's complete adjuvant* buatan Balitvet. Vaksin diberikan kepada hewan dengan dosis 1 x 10⁸ TCID₅₀ per ml atau 1 ml secara subkutan. Vaksinasi kedua diberikan 1 bulan setelah vaksinasi pertama dengan dosis yang sama.

Uji tantang

Satu bulan pasca vaksinasi akhir, separoh dari tiap kelompok hewan tersebut ditantang dengan virus ganas BHV-1 isolat lapangan dengan dosis 2 x 10⁸ TCID₅₀, secara intravena. Setelah 24 jam pasca uji tantang, hewan dicampur menjadi satu kelompok yang tidak terpisah, guna mempercepat kemungkinan kontak di antara seluruh kelompok hewan.

Pengamatan klinis

Semua hewan percobaan diamati secara intensif tiap waktu, tiap hari selama 14 hari pasca uji tantang. Observasi diarahkan pada pernapasan yang tidak normal, batuk yang tiba-tiba, keluarnya cairan mata dan hidung yang berlebihan, hipersalivasi, konjungtifitis dan hiperemis mukosa hidung dan vagina. Parameter ini diamati tiap hari untuk tiap hewan. Skoring 0 untuk yang tidak ada gejala klinis seperti di atas, nilai satu bila ringan, nilai dua bila sedang dan nilai tiga bila berat (KAASHOEK *et al.*, 1994). Lesi pada mukosa hidung dan vagina masing-masing diamati dengan lampu senter pada tiap nostril dan diskor 0 bila tidak ada, nilai satu bila kurang dari 1 cm, nilai dua bila lebih dari 1 cm dan nilai tiga bila semua mukosa ditutupi oleh lesi. Lesi pada mukosa hidung merupakan parameter yang terbaik

untuk tanda klinis dari IBR (BOSCH *et al.*, 1996). Nilai skor kumulatif ditetapkan berdasarkan jumlah skorsing pada aktu pengamatan yang sama. Suhu badan diukur tiap hari selama 14 hari pasca ujiantang melalui rektumnya.

Uji serologi

Setelah satu bulan pasca vaksinasi akhir, seluruh hewan diambil darahnya melalui vena jugularis dengan tabung venoject (*plain tube*). Darah dipisahkan serumnya secara aseptik dan sebelum digunakan untuk pengujian, serum diinaktivasi dengan meletakkan dalam penangas air selama 30 menit pada suhu 56° C. Serum diuji dengan uji serum netralisasi menurut metode standar OIE (1996).

Analisa statistik

Analisis dilakukan dengan membandingkan di antara group vaksinasi dengan kontrol yang dibuat berdasarkan skoring tiap hari dari tiap lesi yang muncul pada mukosa hidung, mukosa vagina dan pengukuran suhu badan. Analisis dilakukan berdasarkan rancangan acak lengkap dan non-parametrik.

HASIL

Respons klinis

Dari hewan-hewan yang mendapat vaksinasi dan separoh daripadanya yang mendapat ujiantang dengan virus ganas BHV-1 isolat lapangan, ternyata tidak satupun yang menimbulkan gejala klinis, baik itu berupa kenaikan suhu badan (Gambar 2) maupun perubahan berupa peradangan mukosa hidung dan mukosa vagina. Tidak terjadi hiperlakrimasi, tidak terjadi hipersalivasi dan tidak terjadi hipersekresi cairan hidung. Sementara itu, pada kelompok hewan kontrol dan mendapatkan ujiantang dengan virus ganas BHV-1 isolat lapangan terlihat gejala klinis berupa kenaikan suhu badan yang dimulai pada hari ketiga dan berakhir pada hari kesembilan pasca ujiantang (Gambar 1). Hal ini berarti bahwa masa inkubasi berlangsung selama tiga hari dan masa sakit berlangsung selama 6 hari. Kenaikan suhu dapat mencapai 40,1° C dan ini dicapai pada waktu yang berbeda-beda di antara hewan kontrol yang mendapat ujiantang. Gejala klinis lainnya pada hewan kontrol yang mendapat ujiantang yaitu berupa peradangan mukosa hidung dan vagina, hiperlakrimasi, hipersekresi cairan hidung dan ulkus yang terlihat pada mukosa hidung dan vagina (Gambar 3). Peradangan terjadi bersamaan dengan peningkatan suhu badan,

yaitu terjadi pada hari ketiga dan berakhir pada saat suhu badan telah menjadi normal kembali. Ulkus yang terbentuk tidak berkembang menjadi besar dan bentuk

Gambar 1. Kenaikan suhu badan pada masing-masing hewan kelompok kontrol setelah mendapat ujiantang dengan virus ganas isolat lapangan BHV-1.

ulkus yang berupa titik-titik sebesar butir beras pada saat peradangan mukosa hidung dan mukosa vagina berakhir sebelum peradangan dan kenaikan suhu badan selesai. Ulkus mudah dikelirukan dengan kerusakan akibat tali hidung dari hewan. Oleh sebab itu, pada saat gejala klinis muncul, keseluruhan tali yang mengikat beberapa hidung hewan dibuka agar peradangan tidak semakin berkembang. Demikian pula ulkus sudah tidak kelihatan sewaktu peradangan dan demam masih terlihat. Hal ini dapat disimpulkan bahwa dampak dari vaksinasi dengan vaksin inaktif buatan Balitvet sangat jelas menghambat munculnya gejala klinis dari virus BHV-1 isolat lapangan pada hewan. Uji *koch postulate* ini sangat baik diperagakan pada hewan-hewan yang divaksinasi dan hewan kontrol. Tanpa vaksinasi terlihat jelas bahwa virus BHV-1 isolat lapangan menimbulkan gejala klinis spesifik IBR pada infeksi buatan, sedangkan dengan vaksinasi gejala klinis IBR tidak terlihat (Gambar 1, 2, dan 3).

Sementara itu separoh dari masing-masing kelompok hewan yang tidak mendapatkan ujiantang, walaupun satu hari setelah ujiantang keseluruhan hewan disatukan dalam satu kandang (dicampur), tidak satupun yang memperlihatkan gejala klinis, baik yang mendapat perlakuan vaksinasi maupun yang tidak

Gambar 2. Perbandingan repons klinis (peningkatan suhu badan) pada sapi Bali yang diuji tantang dan tidak diuji tantang.

mendapat perlakuan vaksinasi (hewan kontrol). Ternyata infeksi alami dari satu hewan yang terinfeksi dan menimbulkan gejala klinis, tidak mampu menimbulkan gejala klinis pada hewan lain yang tidak diinfeksi secara buatan dan tanpa vaksinasi. Demikian pula pada hewan yang divaksinasi dan tanpa uji tantang, tidak memperlihatkan gejala klinis IBR.

Respons serologis

Satu bulan pasca vaksinasi akhir, serum seluruh hewan diuji dengan uji serum netralisasi menggunakan antigen standar galur Colorado. Hasil uji menunjukkan bahwa respons kekebalan terhadap IBR pada vaksinasi booster (dua kali) memberikan titer yang seragam dan tinggi. Titer yang dicapai adalah 2^{11} (2048) dan hanya

satu ekor dari sepuluh ekor hewan yang diuji mencapai titer 2^{10} (1024). Sementara itu, pada kelompok vaksinasi tunggal, dari 10 ekor yang diuji, hanya satu ekor yang mencapai titer 2^{11} (2048), satu ekor mencapai titer 2^{10} (1024), dua ekor dengan titer 2^9 (512), satu ekor dengan titer 2^8 (256), tiga ekor dengan titer 2^7 (128) dan masing-masing satu ekor dengan titer 2^2 (4) dan 2^1 (2). Sebaliknya, pada hewan kontrol ada satu ekor yang memiliki titer yang mencapai 2^8 (256), satu ekor dengan titer 2^4 (16), selebihnya, yaitu 5 ekor memiliki titer 2^1 (2) (Gambar 4.). Walaupun di antara hewan kontrol memperlihatkan titer anti bodi yang agak tinggi titer, ternyata hewan-hewan kontrol tersebut tidak mampu mempertahankan diri dari uji tantang yang dilakukan, sedangkan hewan yang divaksinasi, dapat mempertahankan diri dari uji tantang yang dilakukan

dan tidak satupun yang menunjukkan gejala klinis. Hal ini dapat disimpulkan, bahwa walaupun hasil uji serologis menunjukkan adanya kekebalan humoral dalam tubuh hewan dan mencapai titer 2^8 (256) terhadap BHV-1, tetapi dengan ujiantang, hewan yang tidak divaksinasi tidak mampu mempertahankan infeksi buatan yang dilakukan secara intravena. Sementara itu, pada hewan yang divaksinasi dosis tunggal dengan vaksin inaktif buatan Balitvet, walaupun titer hanya mencapai 2^1 (2), tetapi setelah diujiantang dengan virus ganas BHV-1 isolat lapangan, hewan mampu mempertahankan tubuhnya dari infeksi buatan intravena dan tidak menimbulkan gejala klinis. Kekebalan humoral ternyata tidak mencerminkan keseluruhan proteksi yang dimiliki hewan yang divaksinasi. Dengan kata lain, ada kekebalan lainnya yang berfungsi, yaitu kekebalan selular yang dimiliki hewan yang divaksinasi yang mampu mempertahankan hewan dari infeksi BHV-1 secara buatan.

Gambar 3. Nilai kumulatif skor perubahan gejala klinis hewan kontrol pasca ujiantang.

PEMBAHASAN

Vaksin inaktif dengan *Freund's complete adjuvant* yang dibuat oleh Balitvet ternyata dapat mencegah munculnya gejala klinis akibat ujiantang yang dilakukan pada 30 hari pasca vaksinasi akhir. Hal ini berbeda sangat nyata ($P < 0,001$) bila dibandingkan dengan hewan kontrol tanpa vaksinasi dan diujiantang yang memperlihatkan gejala klinis berupa kenaikan suhu badan yang dimulai pada hari kedua pasca uji

antang dan berakhir hingga hari kesembilan. Di samping itu, pada kelompok hewan kontrol terlihat gejala klinis IBR lainnya berupa peradangan mukosa

Gambar 4. Respons kekebalan pada masing-masing sapi Bali yang mendapat vaksinasi Balitvet BHV-1 isolat lapangan dengan dosis tunggal dan booster.

hidung dan vagina hingga terbentuknya ulkus, hiperlakrimasi dan hipersekresi cairan hidung. Hal ini didukung oleh hasil penelitian dari KUCERA *et al.*, (1978) dan POSPISIL *et al.*, (1996) yang dalam penelitiannya menggunakan vaksin inaktif IBR dan diujiantang intravena dan intranasal. Sebaliknya FRERICHS *et al.*, (1982) menunjukkan bahwa vaksinasi dengan vaksin inaktif tidak memberikan kekebalan pada hewan, yang mana gejala klinis masih muncul sama seperti pada kelompok hewan kontrol yang tidak divaksinasi. Ia juga menyatakan bahwa vaksin inaktif tidak merangsang respons kekebalan pada tubuh hingga minggu ke-15 pasca vaksinasi. Ujiantang dengan virus BHV-1 isolat lapangan pada hewan percobaan biasanya memperlihatkan peningkatan suhu, lesi pada mukosa hidung, hiperlakrimasi, konjungtifitis, hipersekresi cairan hidung, trakheitis dan takhihiperpernoea (FRERICHS *et al.*, 1982). Hal ini berbeda dengan kejadian klinis infeksi alami seperti yang telah diutarakan oleh SAXEGAARD (1970) dan KAHRS (1977) yaitu berupa gangguan saluran pernapasan, konjungtifitis, keguguran, vulvovaginitis, balanopostitis, meningoensefalitis, gangguan saluran pencernaan dan infeksi sistemik.

Respons serologis akibat vaksinasi dengan vaksin inaktif buatan Balitvet cukup tinggi, karena pada kelompok hewan yang divaksinasi dua kali, respons kekebalan mencapai 2048 pada hari ke-30 pascavaksinasi akhir dan hanya satu ekor dari 10 ekor yang divaksinasi dua kali yang mencapai titer 1024. Sementara itu, pada kelompok hewan yang divaksinasi satu kali (tunggal), ada satu ekor yang mencapai titer 2048 dan antibodi sebagian besar hewan mencapai titer 128. Respons serologis vaksin inaktif bervariasi dari satu peneliti ke peneliti lainnya. POSPISIL *et al.* (1996) menyatakan bahwa respons serologis dapat mencapai 128 setelah 42 hari pasca vaksinasi. LUPTON dan REED (1980) menyatakan bahwa vaksinasi dengan vaksin inaktif dapat mencapai titer 1024 pada dua minggu pasca vaksinasi, tetapi setelah satu bulan pasca vaksinasi titer menurun menjadi 512. Ia mengatakan juga bahwa dosis tunggal vaksin inaktif dengan *Freund's complete adjuvant* dapat mencapai titer 1024 setelah 4 minggu pasca vaksinasi. Sementara itu, FLORES *et al.* (1993) menyatakan bahwa 30 hari pasca vaksinasi, hewan yang divaksinasi tidak memperlihatkan respons serologis dan hanya sebagian saja yang memberi titer 2 hingga 16, tetapi hewan tetap tidak memperlihatkan gejala klinis pada pasca uji tantang.

Walaupun titer antibodi masih terlihat pada hewan kontrol, ternyata hewan-hewan kontrol tidak mampu mempertahankan diri dari uji tantang yang dilakukan. Sementara itu, pada hewan yang divaksinasi, keseluruhannya dapat mempertahankan diri dari uji tantang yang dilakukan dan tidak satupun yang menimbulkan gejala klinis. Hal ini menunjukkan peranan kekebalan selular yang dimiliki hewan yang divaksinasi yang mampu mempertahankan hewan dari infeksi BHV-1 secara buatan, seperti yang dilaporkan oleh DAVIES dan CARMICHAEL (1973) serta ROUSE dan BABIUK (1974). Penelitian yang dilakukan oleh FORMAN dan BABIUK (1982) juga menunjukkan bahwa makrofag terutama *alveolar macrophage* sapi berperan dalam *antibody-dependent cell cytotoxicity* pada infeksi oleh BHV-1. Seperti diketahui, BHV-1 merupakan penyakit viral yang sering menyerang saluran pernapasan bagian depan dan memperbanyak diri pada paru-paru. Hasil pengamatannya menunjukkan bahwa infeksi oleh BHV-1 meningkatkan mekanisme pertahanan paru-paru. Demikian pula, FORMAN *et al.* (1982) menyatakan bahwa makrofag merupakan komponen penting dari mekanisme kekebalan inang melawan infeksi penyakit oleh BHV-1, yaitu peranannya sebagai fagositosis dan membunuh virus, menghasilkan interferon dan memecah virus yang menginfeksi sel inang. Hal ini seimbang dengan berkembangnya respons kekebalan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa vaksin IBR-inaktif produksi Balitvet, baik yang diberikan satu

kali atau dua kali sangat efektif dalam mencegah timbulnya gejala klinis pasca uji tantang.

DAFTAR PUSTAKA

- BOSCH, J.C., M.J. KAASHOEK, A.H. KROESE, and J.T. OIRSCHOT. 1996. An attenuated bovine herpesvirus 1 marker vaccine induces a better protective than two inactivated marker vaccines. *Vet.Microb.* 52:223-234.
- DAVIES, D.H and L.E. CARMICHAEL. 1973. Role of cell mediated immunity in the recovery of cattle from primary and recurrent infections with infections with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Infect.Immun.* 8: 510 – 518.
- DUQUE H., R.L. MARSHALL, B.A. ISRAEL and G.J. LETCHWORTH. 1989. Effect of formalin inactivation on bovine herpesvirus 1 glycoproteins and antibody responses elicited by formalin inactivated vaccines in rabbits. *Vaccine.* 7:513-520.
- FLORES, E.F., F.A. OSORIO, E.L. ZANELLA, S. KIT and M. KIT. 1993. Efficacy of a deletion mutant Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine that allows serologic differentiation of vaccinated from naturally infected animals. *Vet. Diag. Invest.* 5: 534 – 540.
- FORMAN, A.J. and L.A. BABIUK. 1982. Effect of infectious bovine rhinotracheitis virus infections on bovine alveolar macrophage function. *Infect. Immun.* 35(3): 1041– 047.
- FORMAN, A.J., L.A. BABIUK, V. MISRA and F. BALDWIN. 1982. Susceptibility of bovine macrophages to infectious bovine rhinotracheitis virus infection. *Infect. Immun.* 35(3): 1048–1057.
- FRERICHS, G.N., S.B. WOODS, M.H. LUCAS, and J.J. SANDS. 1982. Safety and efficacy of live and inactivated infectious bovine rhinotracheitis vaccines. *Vet.Rec.*111: 116 – 122.
- GIBBS, E.P.J. and RWEYEMAMU. 1977. Bovine Herpesviruses. Part 1. Bovine herpesvirus 1. *Vet. Bull.* 47(5):317-343.
- HALLORAN, M.E., M. HABER, I.M. LONGINI JR. and J. STRUCHINER. 1991. Direct and indirect effects in vacines efficacy and vaccine effectiveness. *Am. Jor. Epid.* 133:323-331.
- KAASHOEK, M.J., A. MOERMAN, J.A. MADIE, F.A.M. RIJSEWIJK, J. QOAK, A.L.J. GIELKENS and J.T. OIRSCHOT. 1994. A coventional attenuated g-E negative bovine herpesvirus type-1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine.* 12:439-444.
- KAASHOEK, M.J., A. MOERMAN, K. WEERDMEESTER, M.A.M. VELDUS, F.A.M. RIJSEWIJK and J.T.

- OIRSCHOT. 1995. An inactivated vaccine based on glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine*. 13:342-346.
- KAHRS, R.F. 1977. Infectious bovine rhinotracheitis: A review and up date. *Jor. Am. Vet. Med. Assoc.* 171: 1055-1064.
- KUCERA, C.J., R.G. WHITE and W.H. BECKENHAUER. 1978. Evaluation of the safety and efficacy of an intranasal vaccine containing a temperature-sensitive strain of Infectious Bovine Rhinotracheitis virus. *Am. J. Vet.Res.* 39(4): 607-610.
- LUPTON, H.W. and D.E. REED. 1980. Evaluation of experimental subunit vaccines for infectious bovine rhinotracheitis. *Am. J. Vet.Res.* 41(3): 383-390.
- MARFIATININGSIH, S. 1982. Diagnosa infectious bovine rhinotracheitis-like disease pada sapi Bali di Lampung Tengah. Laporan Tahunan Balai Penyidikan Penyakit Hewan 1976-1981. Direktorat Kesehatan Hewan, Departemen Pertanian.
- MATSUKO, T., T.M. FOLKERTS and C. GALE. 1972. Evaluations in calves of an inactivated bovine rhinotracheitis and para influenza-3 vaccine combined with Pasteurella bactrin. *Jor.Am.Vet.Med.Assoc.* 160: 333-337.
- MC.KERCHER, D.G., B. BIBRACK and W.P.C. RICHARDS. 1970. Effects of the infectious bovine rhinotracheitis virus on the central nervous system of cattla. *Jour. Am.Vet. Med. Ass.* 156 : 1460-1467.
- NOOR, M.A.R., S.I. SITEPU., M.Z. ZAMI, A. SURYADI, and A. PERANGINANGIN. 1983. Penyidikan serologi penyakit infectious bovine rhinotracheitis (IBR) pada sapi di beberapa kabupaten di Sumatera Utara. Laporan Tahunan 1981-1982. Direktorat Kesehatan Hewan. Departemen Pertanian.
- OIE. 1996. *OIE Manual of Standards Diagnostic Test and Vaccines*. 3 rd ed. Office International des Epizooties, Paris, France, 281-290.
- OIRSCHOT, J.T., M.J. KAASHOEK, and F.A.M. RIJSWIJK. 1996. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Vet.Microb.* 53:43-54.
- POSPISIL, Z., J. KREJCI, P. JINEK, P. LANY, D. ZENDULKOVA, and P. CIHAL. 1996. Development of a disease control programme based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. *Vet.Microb.* 53: 199-206.
- ROUSE, B.T., and L.A. BABIUK. 1974. Host defense mechanisms against infectious bovine rhinotracheitis virus: Invitro stimulation of sensitized lymphocytes by virus antigen. *Infect.Immun.* 10: 681-687.
- SAXEGAARD, F. 1970. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus infection of cattle with particular reference to genital infections. *Vet.Bull.* 40: 605 - 611.
- SAROSA, A. 1985. Kajian Prevalensi Serologi Penyakit Infectious Bovine Rhinotracheitis pada Sapi dan Kerbau di Beberapa Daerah di Indonesia. Thesis S₂. Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- SUDARISMAN. 1992. Studi epidemiologi dan isolasi agen penyakit infectious bovine rhinotracheitis pada sapi di Indonesia. Laporan Hasil Penelitian 1992-1993. Balai Penelitian Veteriner. Puslitbangtan, Departemen Pertanian.
- WIYONO, A., P. RONOARDJO, R.J. GRAYDON dan P.W. DANIELS. 1989. Diare ganas sapi: 1. Kejadian penyakit pada sapi Bali bibit asal Sulawesi Selatan yang baru tiba di Kalimantan Barat. *Penyakit Hewan.* 21(38): 77-83.
- ZUSCHEK, F and T.L. CHOW. 1961. Immunogenicity of 2 infectious bovine rhinotracheitis vaccines. *Jor. Am. Vet. Med. Assoc.* 139: 236-237.