

Uji Patogenesis dan Imunogenisitas Isolat Lapang Virus Infectious Laryngo Tracheitis

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

Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16115

(Diterima dewan redaksi 15 Oktober 2003)

ABSTRACT

INDRIANI, R., H. HAMID, R.M.A. ADJID and M. SAEPULOH. 2004. Pathogenicity and immunogenicity local isolat infectious laryngo tracheitis virus. *JITV* 9(2): 122-127.

Infectious laryngotracheitis (ILT) is an acute and contagious respiratory diseases of chicken. The virus is Gallid herpes and belong to family herpesviridae. Two local strains of ILT virus those were BGR-6 and BKS-3 were isolated and their pathogenicity and immunogenicity were further observed after five time pareses on coris allantoic of specific pathogenic free embryonated eggs. The pathogenicity of both isolates to be possible for use as seed vaccine were detected based on pathogenicity indices and antibody response. Experimental specific pathogenic free chicken in isolator cages were infected by the isolates using 10^3 EID₅₀. ILT virus per dose. Clinical syndromes, pathological anatomic lesions, and immunological response were observed in the infected chickens and another group at uninfected chickens as a control. Results showed that either BGR-6 or BKS-3 caused clinical signs with ITPI scores of 0,05 and 0,03 respectively and there were no mortality of infected chickens. The top antibody responces of BGR-6 and BKS-3 were observed at OD 0.90 and 0.44 respectively. It can be concluded that BGR-6 and BBS-3 had low ITPI scores, but BGR-6 gave higher antibody response and can be used as a candidate for seed vaccine.

Key words: Infectious laryngotracheitis, ILT, BGR-6, BKS-3, pathogenicity, immunogenicity

ABSTRAK

INDRIANI, R., H. HAMID, R.M.A. ADJID dan M. SAEPULOH. 2004. Uji patogenesis dan imunogenisitas isolat lapang virus infectious laryngo tracheitis. *JITV* 9(2): 122-127.

Virus infectious laryngotracheitis (ILT) adalah penyebab penyakit pernafasan yang bersifat akut dan menular pada unggas. Virus ini disebut *Gallid herpes* yang termasuk ke dalam famili *herpesviridae*. Dua isolat lapang virus ILT yaitu BGR-6 dan BKS-3 telah berhasil diisolasi untuk kemudian dipelajari patogenesis dan imunogenisitasnya setelah menjalani 5 kali lintasan pada *corioallantoic membran* telur ayam berembrio *spesific pathogenic free*. Patogenesis isolat ditentukan berdasarkan pada *intratracheal patogenicity indices* dan respon antibodi dalam rangka melihat kemungkinan dapat digunakan sebagai bakal vaksin. Kedua isolat diinfeksi pada sekelompok ayam SPF yang dipelihara dalam kandang isolator dengan dosis 10^3 EID₅₀ dan dibandingkan dengan sekelompok ayam kontrol. Gejala klinis, perubahan patologi anatomi, serta respon kekebalan pasca infeksi diamati. Hasil penelitian memperlihatkan kedua isolat memiliki nilai ITPI 0,05 untuk BGR-6 dan 0,03 untuk BKS-3 serta infeksi kedua isolat tidak menyebabkan kematian. Respon antibodi isolat BGR-6 dan BKS-3 pada kelompok ayam terlihat mencapai puncaknya secara urut dengan OD 0,90 dan OD 0,44. Dari penelitian ini disimpulkan isolat BGR-6 dan isolat BKS-3 mempunyai nilai ITPI rendah akan tetapi isolat BGR-6 mempunyai respon antibodi yang lebih baik, sehingga memungkinkan isolat BGR-6 dapat digunakan sebagai biang bakal vaksin.

Kata kunci: *Infectious laryngotracheitis*, ILT, BGR-6, BKS-3, patogenesis, imunogenisitas

PENDAHULUAN

Infectious Laryngotracheitis (ILT) merupakan penyakit pernafasan yang bersifat akut dan sangat menular pada unggas (HANSON dan BAGUST, 1991), disebabkan oleh virus *Gallid herpes* (BAGUST *et al.*, 1997) yang termasuk famili *Herpesviridae* dan subfamili *Alphaherpesvirinae* (BAGUST *et al.*, 2000).

Virus ini mengandung asam *Dioxyribonucleid acid* (DNA), berbentuk ikosahedral, mempunyai *envelope* dengan ukuran 195–250 nm dan hanya memiliki satu serotipe. *Nucleocapsid* dari virus *Gallid herpes*

berdiameter 80-100 nm dan disusun oleh 162 capsomer (BAGUST *et al.*, 1997).

Serangan penyakit ini dapat menyebabkan gangguan pernafasan berat yang disertai muntah darah, kematian, penurunan berat badan serta penurunan produksi (HUGHES *et al.*, 1987). Di Indonesia kasus ILT pernah dilaporkan oleh para peneliti sebelumnya terutama pada daerah industri peternakan yang padat seperti Bogor dan Bekasi (PARTADIREJA *et al.*, 1982; GILCHRIST, 1992; MANGUNWIRYO *et al.*, 1995; WIYONO *et al.*, 1996; HAMID *et al.*, 2001). Serangan penyakit ILT dapat ditanggulangi dengan melakukan program

vaksinasi terutama pada peternakan di daerah terkontaminasi virus ILT. Sementara ini vaksin ILT yang dipergunakan berasal dari luar Indonesia. Untuk mengurangi ketergantungan akan vaksin ILT impor tersebut perlu dicarikan jalan keluar, dengan melakukan isolasi virus ILT lapang yang diharapkan dapat dipergunakan sebagai biang virus vaksin.

Penelitian SAEPULLOH *et al.* (2003), menghasilkan isolat-isolat virus yang kemudian diidentifikasi sebagai isolat ILT. Dua diantara isolat lapang ILT tersebut, yaitu isolat BGR-6 dan BKS-3 akan digunakan dalam penelitian ini untuk mengetahui kemungkinan digunakan sehingga bakal vaksin ILT. Selanjutnya isolat virus ILT lapang BGR-6 dan BKS-3 diatuniasi dan diuji patogenitasnya serta respon imun yang dihasilkannya. Menurut hasil penelitian GUY (1990) virus vaksin ILT yang bersifat tidak patogen mempunyai *intratrachea patogenicity indices* (ITPI) rendah, tetapi mempunyai respon imun yang baik.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui sifat virulensi dan imunogenisitas kedua isolat lapang virus ILT tersebut yang akhirnya dapat dipergunakan sebagai biang virus vaksin ILT isolat lapang.

MATERI DAN METODE

Virus ILT isolat lapang

Virus ILT yang digunakan adalah dua isolat virus ILT lapang asal Bogor (BGR-6) dan asal Bekasi (BKS 3). Isolat-isolat virus ILT lapang tersebut dimurnikan dengan penambahan antiserum *Newcastle diseases* (ND) dan *infectious bronchitis* (IB) kemudian dilintaskan sebanyak 5 kali pada *Chorio Allantoic Membrane* (CAM) telur ayam berembrio *spesific patogen free* (SPF). Kedua isolat virus ILT lapang tersebut diperbanyak dan dititrasikan pada CAM telur ayam berembrio SPF dalam kondisi steril. Cara titrasi ini mengikuti prosedur standar (OIE, 2000). Perhitungan kandungan titer virus mengikuti cara REED dan MUNCH (1938) dengan satuan kandungan virus median *embryo infected dose* (EID₅₀).

Hewan percobaan

Ayam SPF umur 4 minggu digunakan untuk uji patogenisitas dan imunogenisitas dipelihara dalam kandang *isolator*.

Uji patogenisitas

Sebanyak 120 ekor ayam SPF tersebut dibagi ke dalam 3 kelompok yaitu kelompok 1 (isolat BGR-6), kelompok II (isolat BKS-3), dan kelompok III (kelompok kontrol). Setiap kelompok terdiri dari 40 ekor. Masing-masing kelompok ayam tersebut di

infeksi dengan isolat virus ILT dengan kandungan virus 10³ EID₅₀ per ekor secara intranasal dan intratrakea. Perlakuan yang sama diterapkan pada ayam kontrol yang diinfeksi dengan cairan *phosphat buffer solution* (PBS).

Pemeriksaan klinis

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

Index patogenisitas (X) dihitung menurut rumus:

$$X = \frac{\text{Total nilai sakit} + \text{total nilai kematian}}{\text{Total pengamatan}}$$

bersifat *mild* bila nilai ITPI antara 0,0 sampai dengan 0,14 dan bersifat patogen bila nilai ITPI antara 0,2 sampai dengan 0,82.

Pemeriksaan patologik dan histopatologik organ

Pengamatan perubahan patologi anatomi dan histologi pada masing-masing kelompok hewan percobaan dilakukan pada hari ke-1, 4, 7, 9, 14, 21 dan 28 pasca infeksi dengan melakukan bedah bangkai terhadap 4 ekor ayam pada setiap setiap kali pengamatan. Sampel berupa organ trakea, paru-paru, limpa, bursa, dan hati diambil dan dipotong-potong untuk kemudian difiksasi selama 18 jam dalam larutan *Cornoy's* (HAMID, 2001). 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* (HAMID, 2001) untuk kemudian diamati perubahan histopatologi dan dievaluasi menurut GUY *et al.* (1990).

Kriteria mikroskopis skoring lesi trakhea dan laryng yang diperlihatkan pada ayam terinfeksi virus ILT (GUY *et al.*, 1990) adalah:

- 0 = Normal: epitelium terdiri atas kolom-kolom epitel bertingkat
- 1 = Perubahan minimal: mukosa sedikit menebal disebabkan oleh infiltrasi sel lymphosit, *Mucous gland* normal, epitel pada umumnya normal, tidak terdapat focal sinsitia epitel dan *intranuclear inclusion bodies*
- 2 = Perubahan sedang: mukosa menebal yang disebabkan oleh infiltrasi sel radang, pada umumnya epitelia dalam keadaan normal, sedikit perdarahan

- 3 = Perubahan moderat: mukosa menebal yang disebabkan oleh infiltrasi sel radang, terdapat focal sinitia epitel dan *intranucleous inclusion bodies*
- 4 = Perubahan berat: mukosa menebal yang disebabkan edem, cairan protein, dan eksudat, permukaan mukosa ditutupi oleh lapisan tipis sel-sel basal, terdapat focal sinitia epitel dan *intranucleous inclusion bodies*
- 5 = Perubahan yang sangat berat: perubahan seperti pada perubahan berat, juga terlihat mukosa tidak memiliki sisa epithelium dan terdapat sinitia dengan *intranucleous inclusion bodies*

Pengamatan serologi

Pengambilan serum darah sebanyak 10 sampel secara berkala dilakukan pada hari ke-1, 4, 7, 9, 14, 21, 28, 35, 42, 49 dan 56 pasca infeksi. Serum darah tersebut diuji dengan *enzymelinked immunosorbent assay* (ELISA) (INDRIANI *et al.*, 2002).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji patogenesis dan imunogenesis virus ILT isolat lapang, BGR-6 dan BKS-3 dimulai dengan melintaskan virus ILT pada pengenceran tertinggi yang masih memberikan lesi pock pada CAM telur embrio tertunas ayam SPF sebanyak 5 kali berturut-turut, sehingga diperoleh isolat virus ILT P5. Pada lintasan ke lima (P5) kandungan virus diukur. Hasil yang diperoleh memperlihatkan kandungan virus untuk BGR-6 adalah

10⁶/0,1 ml, sementara untuk isolat BKS-3 adalah 10⁵/0,1 ml.

Pengamatan klinis pada kelompok ayam percobaan terinfeksi isolat BGR-6 dan BKS-3 serta kelompok kontrol selama 8 hari pengamatan tertuang pada Tabel 1. Gejala klinis yang khas ILT seperti gangguan depresi, atau gangguan pernafasaan berat seperti sesak nafas dan muntah darah atau kematian tidak terlihat pada kedua kelompok ayam. Namun gejala klinis yang sangat ringan seperti paruh ayam terbuka (sesak nafas) dari beberapa ekor ayam yang diinfeksi baik dengan isolat BGR-6 maupun BKS-3 dapat ditemukan seperti tertuang pada Tabel 1. Data pada Tabel 1 menyimpulkan bahwa *Intratracheal patogenicity index* (ITPI) pada kedua isolat tersebut rendah yaitu 0,05 untuk isolat BGR-6 dan 0,03 untuk isolat BKS-3. Hasil ITPI ini sejalan dengan hasil penelitian GUY *et al.* (1990) yang menyatakan bahwa virus ILT yang bersifat *mild* mempunyai nilai ITPI antara 0,0 sampai dengan 0,14.

Pengamatan patologi anatomi mulai hari ke-1 sampai dengan hari ke 28 pasca infeksi menunjukkan bahwa hemoragis pada konjungtiva terlihat pada hari ke-1, 4 dan 7 baik pada isolat BGR-6, BKS-3 maupun pada kontrol sedangkan lesi daripada laryng dan trakea dari organ yang terinfeksi kedua isolat BGR-6 dan BKS-3 terlihat pada waktu-waktu pengamatan dari semua sampel, sementara pada kelompok kontrol hanya terlihat lesi laryng pada beberapa ayam hari ke-4, 7 dan 21. Penebalan selaput rongga udara terlihat pada sampel isolat BGR-6, BKS-3 maupun kontrol pada semua waktu pengamatan.

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

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

Tabel 2. Hasil pengamatan patologi anatomi ayam percobaan pasca infeksi isolat lapang virus ILT

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

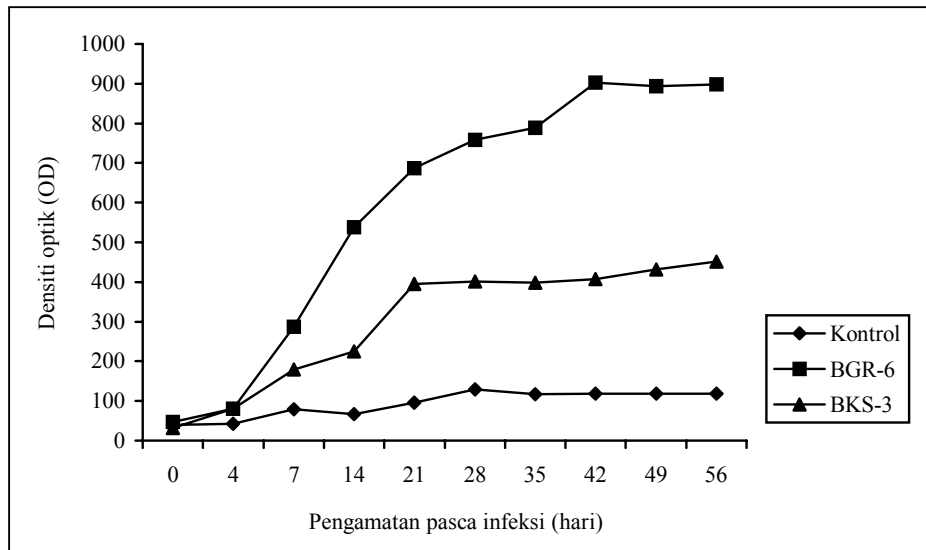
Lesi sinus pada kedua isolat terlihat pada hari pertama, sedangkan pada kontrol terlihat pada hari ke-7, 9 dan 28 pasca infeksi. Pada beberapa kasus ditemukan eksudat serous pada lumen trakhea. Beberapa kasus menunjukkan perubahan pada paru berupa *focal consolidation*, sedangkan pada organ lainnya tidak terlihat adanya perubahan. Tidak ditemukan perubahan

yang spesifik pada organ limfoid seperti limpa dan bursa fabrisius pada semua kelompok ayam.

Perubahan histopatologi pada organ trakhea dan laryng pasca infeksi isolat lapang virus ILT BGR-6 (kelompok 1) dan BKS-3 (kelompok 2), serta kelompok kontrol (3) terlihat pada Tabel 3.

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

Isolat	Aspek lesi	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	trakhea	0	0,25	0	0	0,50	0	0
	laryng	0	0,25	0	0	0,50	0,50	0,25



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

Perubahan secara histopatologi pada trakhea dan laryng dari organ yang terinfeksi isolat BGR-6 dan BKS-3 berada diantara nilai 0 dan 2. Mengacu pada penilaian GUY *et al.* (1990) yang menyatakan bahwa nilai kerusakan histopatologi pada trakhea dan laryng lebih dari 2, menunjukkan kerusakan oleh virus ILT yang bersifat ganas. Dari pengamatan ini terlihat bahwa kedua isolat virus ILT BGR-6 dan BKS-3 termasuk ke dalam virus ILT yang bersifat *mild* atau ringan ini didukung dengan tidak terlihatnya badan inklusi pada trakhea (GUY *et al.*, 1990).

Perubahan histopatologi pada organ lain seperti paru, terlihat respon imunologi pada *Bronchial Associated Lymphoid Tissue* (BALT) yang ditunjukkan dengan adanya respon positif dari BALT dengan ciri-ciri beberapa limfoid folikel yang terdiri dari sel-sel limfosit dan makrofa sejak minggu pertama pengamatan. Menurut PURCELL (1971) adanya respon positif dari BALT, merupakan perubahan yang disebabkan oleh reaksi imun akibat reaksi BALT tersebut terhadap antigen virus ILT dari isolat yang diberikan. Perubahan ini bukan merupakan kerusakan akibat virus ILT yang bersifat *mild* (GUY *et al.*, 1990), tetapi merupakan respon dari reaksi antigen. Pada beberapa potongan paru kadang-kadang juga terlihat adanya *muko purulent eksudat* pada lumen bronchus. Pada sinus tidak ditemukan perubahan sejak minggu pertama sampai akhir pengamatan.

Limfoid organ seperti limpa dan bursa, selama masa pengamatan tidak ditemukan kelainan spesifik. Perubahan di atas menunjukkan hewan percobaan yang digunakan dalam keadaan sehat, tidak terlihat adanya perubahan-perubahan ke arah immunosupresif.

Hasil respon serologi dengan ELISA menunjukkan bahwa, kedua isolat sama-sama memiliki daya rangsang

imunologis pada ayam yang diinfeksi (Gambar 1). Respon imunologis ayam SPF percobaan diekspresikan dalam nilai densitas optik. Kelompok ayam SPF yang diinfeksi dengan isolat BGR-6, respon antibodi, mulai tampak 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-56 (OD= 0,44). Kenaikan titer antibodi tidak terlihat pada beberapa ayam kontrol. Nilai OD selalu kurang dari 0,2 selama masa pengamatan. Pola respon imunologis ayam yang diinfeksi dengan isolat lapang virus ILT BGR-6 dan BKS-3 tampak serupa, namun tingkat daya rangsangnyanya tampaknya berbeda. Isolat virus ILT BGR-6 tampaknya memiliki daya rangsang imunogenisitas yang lebih baik dari isolat BKS-3. Untuk mengetahui apakah antibodi yang dihasilkan akibat infeksi ILT isolat BGR-6 dapat melindungi ayam tersebut dari serangan ILT kiranya perlu ujiantang dengan menggunakan virus ILT ganas.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa isolat lapang virus ILT BGR-6 dan BKS-3 mempunyai patogenisitas rendah namun isolat BGR-6 memiliki daya imunogenisitas yang lebih baik dibandingkan dengan isolat BKS-3. Untuk menentukan apakah isolat BGR-6 lebih memungkinkan untuk dijadikan bakal vaksin ILT lokal, kiranya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan ujiantang menggunakan virus ganas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Heri Hoerudin, Apippudin, Murniati, Yudi dan semua pihak yang membantu baik dalam penelitian maupun penulisan.

DAFTAR PUSTAKA

- BAGUST, T.J and J.S. GUY. 1997. Laryngotracheitis. *In: Diseases of Poultry*. 10th edition. B.W. CALNECK, H.J. BARNES, BEARD, C.W., L.R. MCDUGALD and Y.M. SAIF. (Eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. pp. 527-539.
- BAGUST, T.J., R.C. JONES and J.S. GUY. 2000. Avian infectious laryngotracheitis. *Rev. Sci. Technol. Int. Epiz.* 19: 483-492.
- GUY, J.S., H.J. BARNES and 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 ocular form of infectious laryngotracheitis (ILT) in Bekasi. Report for Balitvet Bogor.
- HAMID, H., M. SAEPULLOH, RISA INDRIANI dan DARMINTO. 2001. Deteksi Infectious Laryngotracheitis (ILT) secara Patologik. Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 17-18 September 2001. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. hlm. 700-707.
- HANSON, L.E. and T.J. BAGUST. 1991. Laryngotracheitis. *In: Diseases of Poultry*. 9th editions. B.W. CALNEK (Eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. pp. 485-495.
- HUGHES, C.S., R.C. JONES, R.M. GASKELL, F.T.W. JORDAN and 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: 130-137.
- MANGUNWIRYO, H., DARMINTO dan ZULKIFLI. 1995. Survei serologik terhadap infectious laryngotracheitis (ILT) pada ayam buras dan ras di Jawa Barat. Pros. Seminar Nasional Teknologi Veteriner untuk Meningkatkan Kesehatan Hewan dan Pengamanan Bahan Pangan Asal Ternak. Cisarua, Bogor 22-24 Maret 1994. Balai Penelitian Veteriner, Bogor. hlm. 140-147.
- OFFICEACE, I. E. 2000. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccine. Avian Infectious Laryngotracheitis. pp. 549-554. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- PARTADIREDJA, M., R.D. SOEDJOEDONO dan S. HARDJOSWORO. 1982. Kasus infectious laryngotracheitis di daerah Bogor, (Isolasi dan identifikasi virus dengan cara pewarnaan). Pros. Seminar Penelitian Peternakan. Puslitbang Peternakan Bogor. Cisarua, Bogor 8-11 Februari 1982. hlm. 522-525.
- PURCELL, D.A. 1971. Histopathogy of infectious laryngotracheitis in fowl infected by an aerosol. *J. Comp. Path.* 81: 421-431.
- REED and MUNCH. 1938. A simple methode of estimating fifty percent end-point. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.
- SAEPULLOH, M., H. HAMID dan DARMINTO. 2003. Isolasi dan identifikasi isolat lapang virus infectious laryngotracheitis. Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 29-30 September 2003. Puslitbang Peternakan, Bogor. hlm. 424-430.
- WIYONO, A., S. MUHARAM, S. ANTONIUS dan DARMINTO, 1996. Sebaran titer antibodi infectious laryngotracheitis (ILT) pada ayam ras dan buras di Kabupaten Cianjur, Tangerang dan Karawang. Pros. Temu Ilmiah Nasional Bidang Veteriner, Bogor 12-13 Maret 1996. Balai Penelitian Veteriner, Bogor. hlm. 88-95.