

Content

Volume : 24 / No. : 1 / Pub. : 2008-01

1. Antigenicity, sensitivity and spesificity of 27-28 kda protein of fasciola spp excretory-secretory (es) material for distomatosis diagnosis in cattle sera by using indirect-elisa techniqe
2. Detection of toxoplasma gondii on the local chicken eggs sold as the mixture of traditional medicine in surabaya using biological test
3. Identification of avian reovirus in chickens with tenosynovitis using indirect sandwich-elisa and protein characterization by western blot
4. The inhibition of vitamin e (α- tocopherol) antioxidant to superoxide radical reactive oxygen species (o2.-) production on the white rat (rattus norvegicus)stressed by an electric shock
5. Intravenous phosphate infusion results in hyperphosphatemia and hypocalcemia without changing in plasma parathyroid hormone and calcitriol concentrations in goats
6. Ultrasonography Diagnostic For Detection Of The Uterus Disorders In Cats (felis Catus)
7. Potency of mengkudu (morinda citrifolia) juice extraction on carcass quality, vitamin c level and malonedialdehyde (mda) level in broiler's blood
8. Comparison of fertility of etawa crossbred goats in low versus ideal body condition score after estrus synchronization and artificial insemination
9. Digestibility and consumption of dry matter and organic matter in haylage complete feed ongole crossbreed steers
10. The increase of desidual macrophages activity in infected toxoplasma gondii pregnant mice
11. Restricted feeding delayed sexual maturation, decrease biometry of reproductive organ and fat deposition of quail hens (coturnix coturnix japonica)
12. Detection of toxoplasma gondii on the local chicken eggs sold as the mixture of traditional medicine in surabaya using biological test
13. The increase of desidual macrophages activity in infected toxoplasma gondii pregnant mice

Identifikasi Avian Reovirus pada Ayam Penderita Tenosynovitis menggunakan Indirect Sandwich-ELISA dan Karakterisasi Protein dengan Western Blot

Identification of Avian Reovirus in Chickens with Tenosynovitis using Indirect Sandwich-ELISA and Protein Characterization by Western Blot

Suwarno, Adi Prijo Rahardjo, Nanik Sianita Widjaja, Jola Rahmahani, Rahaju Ernawati dan Fedik A. Rantam

Departemen Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
Jl. Mulyorejo Surabaya-60115. Tlp. 031-5992785.
e-mail : snow_arno@yahoo.co.id

Abstract

The aims of this study were identified of avian reovirus (ARV) from the chickens with tenosynovitis by indirect sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (is-ELISA), and analysis of protein virus by sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE), and characterized of protein by western blot. Several chickens from flock with the hock-joint disturbance used a sample in the study. Virus was isolated in chicken embryonated eggs (CEE) and chicken embryo fibroblast (CEF) from the lymph, respiratory tract (trachea), gastrointestinal tract (intestine), synovial fluid and hock-joint suspension of suspected chick with the AEV infection. The viral isolate was well adopted and titrated at second passage level in CEE and CEF. The is-ELISA revealed that the isolate is of reovirus. In western blot protein of ARV detected was antigenic and have molecular weight were 147,5; 130,6; 114,3; 74,1; 70,8; 41; 38,8 and 31,7 kDa.

Key words: Avian reovirus, hock-joint, antigenic protein, sandwich-ELISA, western blot

Pendahuluan

Avian reo (*respiratory enteric orphan*)-virus (ARV) merupakan agen penyakit penting pada peternakan ayam dan kalkun di seluruh dunia. Infeksi ARV menyebabkan kondisi multi penyakit, seperti *viral arthritis*, *tenosynovitis*, *stunting/runting syndrome*, penyakit pernafasan, penyakit *enteric* dan *malabsorption syndrome*. Virus dapat diisolasi dari berbagai jaringan, seperti jantung, hati, limpa, ginjal, bursa, *hock-joint* dan sumsum tulang (Van der Heide, 2000; Phillips, 2001; Astawa, 2006). Sejauh ini identifikasi protein untuk mengetahui karakter ARV isolat lokal belum banyak dilakukan.

Berbagai teknik diagnosis untuk deteksi ARV telah dilakukan dengan berbagai cara, seperti serologik, virologik, molekuler dan genetik. Secara serologik dengan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), *immunofluorescence* (IF), *virus neutralization* (VN); virologik dengan mikroskop elektron; molekuler melalui analisis protein, polipeptida dan genom virus dengan *sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) atau dengan *nested reverse transcriptase polymerase chain reaction* (n-RTPCR); dan

secara genetik dengan melakukan *sequencing* (Liu *et al.*, 1999; Shmulevitz *et al.*, 2002; Tamehiro *et al.*, 2003).

Avian reovirus merupakan anggota dari genus *Orthoreovirus*, satu dari sembilan genera famili *Reoviridae*. Virion ARV berukuran 70-80 nm, tidak beramplop, berbentuk ikosahedral dan berreplikasi di dalam sitoplasma sel terinfeksi. Selubung kapsid terdiri dari dua lapis protein dan genom virus terbagi menjadi 10 segmen ds-RNA, yang menyandi delapan protein struktural dan dua protein non-struktural. Segmen genom terbagi menjadi empat kelas berdasar ukuran, yakni *large* (L), *medium* (M) dan *small* (S). Genom L menyandi protein lambda (λ A, λ B dan λ C), genom M dengan protein mu (μ A, μ B, μ BC, μ BN dan μ NS) dan genom S menyandi protein sigma (σ A, σ B, σ C dan σ NS). Protein μ B, μ BC, μ BN, σ B dan σ C merupakan komponen luar dari kapsid, sedangkan protein λ A, λ B, μ A dan σ A adalah bagian dari inti virus. Protein λ C terletak pada kedua komponen, mulai dari lapisan dalam inti sampai lapisan luar kapsid. Protein μ BC dan μ BN merupakan produk *site-specific cleavage* dari μ B (Varela dan Benavente, 1994; Nibert *et al.*, 1996; Martinez-Costas *et al.*, 1997).

Di antara ke-10 macam protein, σC berperan kunci dalam infeksi dan pathogenesis ARV. Protein ini juga dihubungkan dengan aktivitas perlekatan sel, pembentukan sinsitium dan netralisasi pada infektivitas virus, serta potensial dijadikan sebagai kandidat vaksin (Wickramasinghe *et al.*, 1993; Shapouri *et al.*, 1995; Martinez-Costas *et al.*, 1997; Grande *et al.*, 2002). Avian reovirus memiliki sifat yang sama dengan duck reovirus dalam hal susunan kapsid, kemampuan membentuk sinsitium, dan tidak dapat mengaglutinasi eritrosit, tetapi secara antigenisitas berbeda (Kuntz-Simon *et al.*, 2002). Terdapat perbedaan pathogenisitas antar strain ARV. Strain virulen 176 dapat menyebar dan replikasi pada semua jaringan, serta menyebabkan lesi ekstensif dan berat. Sementara itu, strain *mild* 883 hanya menyebabkan lesi minimal pada jaringan tertentu (Ni dan Kemp, 1995; Jones, 2000).

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi ARV secara langsung dari berbagai organ ayam penderita tenosynovitis dengan is-ELISA. Protein virus kemudian dipreparasi dan dianalisis dengan SDS-PAGE, serta dilanjutkan karakterisasi protein dengan *western blot* menggunakan antibodi anti-reovirus isolat lokal.

Metode Penelitian

Preparasi sampel dan isolasi virus

Lima ekor ayam pedaging masing-masing berasal dari dua flock peternakan yang berbeda, digunakan sebagai sampel. Satu flock dengan gangguan pertumbuhan dan kelumpuhan (flok I), serta flock lainnya dengan kelumpuhan dan pembengkakan sendi kaki (flok II). Beberapa organ dan cairan tubuh, seperti limpa, saluran pencernaan (usus), saluran pernafasan (trachea), cairan sinovial, *hock-joint* dan serum dikumpulkan. Organ tersebut kemudian digerus dan dibuat suspensi 10% dengan penambahan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) yang mengandung antibiotik (100 IU penisilin dan streptomisin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ suspensi). Sebagian suspensi langsung diperiksa secara serologik dan sebagian lagi suspensi diinokulasikan pada *chorioallantoic membrane* (CAM) telur ayam berembrio (TAB) umur 9 hari dengan dosis 0,1 ml/butir. Isolasi virus pada kultur sel CEF ditumbuhkan pada media *Dolbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) dan *Rose Park Memorial Institute* (RPMI) yang mengandung *Foetal Bovine Serum* (FBS) 0,5%. Pengamatan dilakukan selama 4 hari dan pada akhir pengamatan semua TAB dan kultur sel diidentifikasi melawan antibodi anti-reovirus dengan teknik is-ELISA (Olson, 1980).

Antibodi anti-ARV

Antibodi anti-ARV diproduksi pada mencit dan ayam. Imunisasi pada mencit menggunakan ARV strain S1133 dan pada ayam menggunakan ARV isolat lokal.

Identifikasi virus dengan *indirect sandwich-ELISA*

Identifikasi terhadap ARV dilakukan dengan metode yang dikembangkan oleh Suwarno (2005). Sebanyak 100 μl antibodi primer (mencit anti-ARV dengan pengenceran 1/100) di-coating pada sumuran mikroplat ELISA menggunakan bufer coating (50 mmol karbonat, pH 9,6) dan diinkubasi pada suhu 4°C semalam. Selanjutnya sumuran mikroplat dicuci 4 kali dengan bufer washing (0,15 M NaCl; 0,05% Tween-20; pH 8,6) dan diblok menggunakan bufer blocking (PBS-Tween pH 7,4 yang mengandung 4% skim milk) sebanyak 200 $\mu\text{l}/\text{sumuran}$ dan diinkubasi pada suhu 37°C 1 jam. Berikutnya sumuran mikroplat dicuci 4 kali, untuk kemudian ditambahkan suspensi yang diduga mengandung ARV (berasal dari cairan sinovial, suspensi *hock-joint*, limpa, usus, trachea, serum dan CAM TAB) pada pengenceran 1/50, 1/100 dan pekat, sebanyak 100 $\mu\text{l}/\text{sumuran}$ dan diinkubasi pada suhu dan waktu yang sama. Sebagai kontrol positif digunakan ARV isolat lokal dan ARV-S1133, serta sebagai kontrol negatif berupa organ sama berasal dari hewan dan TAB normal. Pasca pencucian, sumuran mikroplat ditambah dengan antibodi sekunder (ayam anti-ARV pada pengenceran 1/100) sebanyak 100 $\mu\text{l}/\text{sumuran}$ dan diinkubasi kembali. Tahap berikutnya sumuran mikroplat dicuci dan seterusnya ditambah dengan konjugat *goat anti-chicken Ig G* yang dilabel dengan alkali fosfatase, serta diinkubasi kembali. Tahap terakhir setelah proses pencucian, setiap sumuran mikroplat ditambah dengan substrat p-NPP 2,7 mmol/l (dalam bufer substrat yang mengandung 1 M dietanolamin; 0,5 M MgCl_2 , pH 9,8) sebanyak 100 μl , diinkubasi suhu kamar pada ruang gelap. Tigapuluh menit kemudian reaksi dihentikan dengan menambahkan 50 μl NaOH 3 N pada tiap sumuran dan resapan dibaca pada ELISA reader pada panjang gelombang 405 nm.

Analisis protein dengan SDS-PAGE dan *Western blot*

Analisis protein terhadap ARV dilakukan dengan teknik SDS-PAGE menggunakan komposisi gel 12%. Sebanyak 15 μl sampel didenaturasi dengan bufer *Laemmli* dan diinkubasi pada suhu 42°C selama 2 jam, kemudian dimasukkan dalam sumuran pada *stacking gel*. Elektroforesis dijalankan dengan tegangan 120 V dan kuat arus 25 mA selama kurang lebih 1 jam. Gel kemudian dicuci untuk selanjutnya diwarnai dengan *Coomassie blue* (larutan fiksasi 33,3% methanol dan 10% asam asetat yang mengandung 0,25% *Coomassie blue*) selama 30 menit. Berikutnya gel disimpan dalam larutan asam asetat 10%. Untuk *western blot*, protein tanpa diwarnai ditransfer pada membran nitoselulose selama 1 jam dengan kuat arus 100mA dalam *semidry blotting apparatus*. Membran kemudian diblok dengan 1% *Bovine Serum Albumin*

(BSA) selama 20 menit dan dicuci 3x5 menit dengan PBS-Tween, ditambahkan antiserum ayam anti-ARV pada konsentrasi 1/100 selama 3 jam. Membran dicuci 3x5 menit dan ditambah konjugat *goat-antichicken* pada konsentrasi 1/1000 selama 1 jam. Tahap akhir, membran dicuci 3x5 menit dan diwarnai dengan *western blue* (Grande *et al.*, 2002).

Analisis data

Data berupa nilai *Optical Density* (OD) hasil pembacaan ELISA ditentukan berdasarkan *Cut off Value* (COV). Nilai OD sampel dinyatakan positif apabila memiliki COV sebesar 1,5 kali dari rata-rata kontrol negatif (de Savigny dan Voller, 1980).

Hasil dan pembahasan

Data pada Tabel 1 menunjukkan hasil pengujian sejumlah organ terhadap adanya ARV dengan teknik is-ELISA. Semua organ yang diperiksa memberikan hasil positif (+), kecuali serum darah dengan hasil negatif. Batasan positif didasarkan atas COV

sebesar 0,197. Nilai OD sampel $\geq 0,197$ dinyatakan positif (de Savigny dan Voller, 1980).

Hasil identifikasi menunjukkan, bahwa ARV dapat dideteksi secara langsung di sejumlah organ, seperti cairan sinovial, *hock-joint*, limpa, trachea dan usus. Berdasarkan hasil identifikasi dengan is-ELISA terdapat pola yang sama antara ARV isolat lokal dengan ARV yang berhasil diisolasi pada penelitian ini. Perbedaan pola justru muncul jika dibandingkan dengan kontrol positif ARV-S1133. Antibodi anti-ARV isolat lokal kurang dapat mengikat ARV-S1133, sehingga memberikan nilai OD yang rendah. Diduga terdapat perbedaan genetik antara ARV-S1133 dengan ARV hasil isolasi. Menurut Shumelevitz *et al.* (2002), antara strain avirulen ARV-1133 dengan strain virulen ARV-76 memiliki urutan sekuens nukleotida dengan derajat tinggi pada segmen genom S1 dan terdapat 20 nukleotida yang mengalami salah letak. Perubahan ini terjadi pada ujung -3' *Open Reading Frame* (ORF) *cC* dan urutan 450 nukleotida pada ujung -5', yang menyebabkan antigenesitas dari kedua strain ini berbeda.

Tabel 1. Hasil Identifikasi Avian Reovirus dari Sejumlah Organ Ayam Pedaging dengan Teknik is-ELISA

Asal Peternakan	Jenis Sampel	Kisaran Nilai OD	Keterangan
Flok I	Cairan sinovial	0,712-1,688	+
	<i>Hock Joint</i>	0,734-1,030	+
	Limpa	0,578-0,581	+
	Trachea	0,499-0,545	+
	Usus	0,616-0,679	+
	Serum	0,184-0,195	-
Flok II	Cairan sinovial	2,063-2,100	+
	<i>Hock Joint</i>	2,082-2,648	+
	CAM TAB	0,299-0,532	+
Kontrol	Kontrol Negatif	0,129-0,135	-
	Kontrol Positif S1133	0,305-0,320	+
	Kontrol Positif isolat lokal	0,665-0,674	+

is-ELISA = *indirect sandwich-ELISA*, OD = *optical density*; CAM TAB = *chorioallantois; membrane telur ayam berembrio*, + = positif, - = negatif.

Tabel 2. Hasil Pengamatan Pertumbuhan Avian Reovirus Pada TAB dan Kultur Sel CEF yang Diidentifikasi dengan is-ELISA

Jenis Kultur	Perubahan	Identifikasi is-ELISA
CAM TAB	Bintil <i>pock</i>	+
Sel CEF	CPE (sinsitium)	+

CEF = *chicken embryo fibroblast*; CPE = *cytopathic effect*.

Secara nyata tersirat, bahwa cairan sinovial dan *hock-joint* memiliki kandungan virus tertinggi dibanding organ lainnya, karena *hock joint* merupakan *cell tropism* bagi ARV. Infeksi ARV dapat menyebabkan pembengkakan bilateral tendon fleksor digitalis dan ekstensor tarsometatarsal, serta pecahnya tendon gastroknemius (Fenner *et al.*, 1995). Organ dalam, seperti limpa yang berperan sebagai penyaring antigen juga menunjukkan kandungan virus cukup tinggi, selain trachea dan usus. Pengujian serum dengan hasil negatif dapat disebabkan karena infeksi sudah berjalan beberapa hari, sehingga fase viremia sudah berlalu. Menurut Ni dan Kemp (1995) dan Huang (1995), beberapa strain ARV virulen setelah infeksi melalui saluran gastrointestinal dapat menyebar ke seluruh organ tubuh, dan menetap menjadi infeksi persisten. Salah satu manifestasi pada infeksi kronik adalah timbulnya arthritis pada tendon. Infeksi pada sel tendon menunjukkan, bahwa pelepasan progeny virus masih berlangsung sampai hari ke-16. Pada penelitian ini belum dapat dibedakan ada tidaknya hubungan antigenik antara strain ARV yang menginfeksi flock I dan flock II.

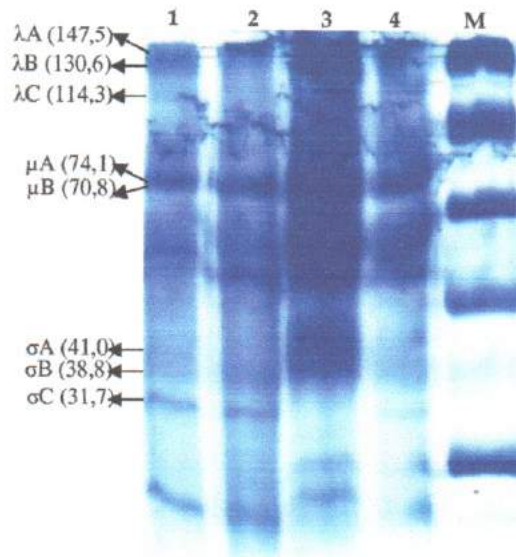
Data pada Tabel 2 menunjukkan hasil pengamatan terhadap perubahan pada CAM TAB dan kultur sel CEF pasca inokulasi dengan isolat virus. Hasil isolasi virus pada TAB dan kultur sel CEF, kemudian dideteksi dengan cara yang sama juga menunjukkan hasil positif. Pertumbuhan virus pada CAM TAB ditandai dengan timbulnya bintil-bintil *pock* berwarna merah muda, sedangkan pada kultur sel dijumpai adanya *cytopathic effect* (CPE) berupa bentukan sinitium (Olson, 1980). Perubahan ini menunjukkan adanya pertumbuhan virus. Teknik isolasi sangat bermanfaat terutama untuk memperbanyak jumlah virus dan mempermudah deteksi. Beberapa sampel yang semula menunjukkan hasil negatif, setelah diisolasi pada TAB dan kultur sel CEF menjadi positif. Menurut Labrada *et al.* (2002), CPE pada kultur sel CEF timbul akibat ARV menginduksi apoptosis. Apoptosis yang diprogram melalui *intracellular apoptotic* terjadi pada tahap awal siklus hidup virus.

Hasil analisis protein ARV dengan teknik SDS-PAGE menggunakan pewarnaan *Coomassie blue* dapat dilihat pada Gambar 1. Teknik SDS-PAGE hanya dapat menunjukkan protein pada bagian inti, yakni λA dengan berat molekul 147,5 kDa; λB 130,6; λC 114,3; μA 74,1 dan σA 41; sedangkan bagian luar kapsid adalah protein μB 70,8; σB 38,8 dan σC 31,7 kDa. Martinez-Costas *et al.* (1997) dengan menggunakan ARV-1133 mendapat gambaran hampir sama

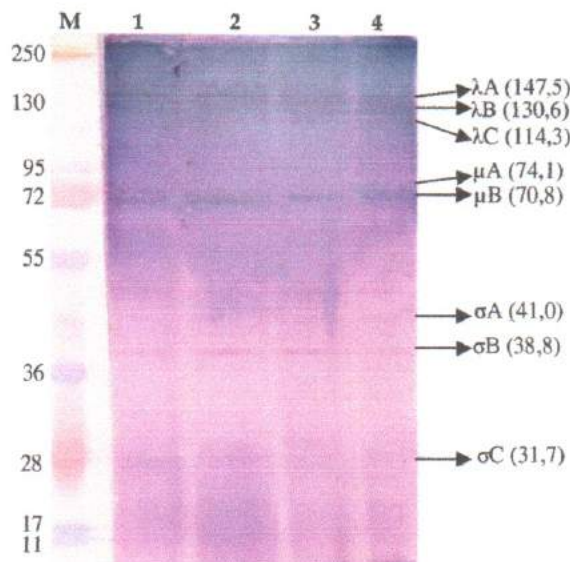
tentang berat molekul protein. Berturut-turut gambaran protein bagian inti ARV-1133 masing-masing dengan berat molekul 147, 130, 120, 79 dan 43 kDa, sedangkan protein bagian luar kapsid masing-masing dengan berat molekul 72, 42 dan 34 kDa. Pada penelitian ini protein yang tercat tebal (λA , μB dan σB) tampak dominan dan dapat dihubungkan dengan persentase bagian virion yang lebih besar dibanding protein lain yang terlihat lebih tipis. Menurut Schnitzer *et al.* (1982) virion tersusun atas polipeptida λA sebesar 12%, λB 1%, λC 9%, μA 6%, μB 32%, σA 9%, σB 30%, dan σC 1%.

Identifikasi protein secara imunologik dapat dilihat pada Gambar 2. Gambaran *western blot* menunjukkan, bahwa protein tersebut bersifat antigenik karena bereaksi secara spesifik dengan antibodi ayam anti-ARV. Spesifikasi protein yang terlihat pada *western blot* menggambarkan, bahwa protein tersebut dapat dijadikan sebagai antigen diagnostik untuk mengidentifikasi ARV secara serologik. Keterbatasan dari penelitian ini adalah, bahwa teknik SDS-PAGE dan *western blot* tidak dapat memunculkan seluruh protein yang disandi oleh genom ARV. Beberapa peneliti dapat menunjukkan seluruh protein sandi melalui teknik SDS-PAGE dengan gel *hydrolink* untuk menganalisis polipeptida yang dilabel dengan [³⁵S]methionine, [³H]myristate, [³H]glucosamine atau [¹²⁵I]. Pembacaan SDS-PAGE dilakukan dengan visualisasi melalui fluorografi (Varela dan Benavente, 1994; Varela *et al.*, 1996; Martinez-Costas, 1997).

Beberapa protein ARV memiliki fungsi spesifik dalam pathogenesis penyakit. Pertile *et al.* (1995) menjelaskan, bahwa penyebaran ARV dalam tubuh terjadi atas peran sel makrofag pada limpa. Makrofag merupakan populasi target sel untuk replikasi ARV. Protein μB pada bagian luar kapsid yang disandi oleh genom M (μ -class) terlibat dalam penetrasi virus dan aktivasi transkriptase pada makrofag (O'Hara *et al.*, 2001). Protein lain yang berfungsi dalam pathogenesis sebagai perlekatan virus dan fusi sel adalah protein σC dengan berat molekul 35 kDa yang disandi oleh genom S1 (σ -class). Protein non-struktural transmembran (p10 dan p17) yang juga disandi oleh genom S1 berhubungan dengan sel membrane pada saat infeksi (Martinez-Costas *et al.*, 1997; Shmulevitz dan Duncan, 2000). Menurut Grande *et al.* (2002), protein 35 kDa adalah bentuk monomer C, sedangkan bentuk multimer σC merupakan suatu homooligomer yang terdiri dari tiga subunit monomer. Peran protein σA yang disandi oleh genom S2 sebagai pelindung terhadap interferon dilaporkan oleh Martinez-Costas *et al.* (2000).



Gambar 1. Hasil analisis protein Avian Reovirus dengan SDS-PAGE menggunakan pewarnaan *Coomassie blue*. Kolom 1-4 sampel, kolom M marker.



Gambar 2. Hasil karakterisasi protein Avian Reovirus dengan *Western blot* menggunakan pewarnaan *western blue*. Kolom 1-4 sampel, kolom M marker.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut: 1) Avian reovirus dapat dideteksi secara langsung dari organ tertular dengan teknik is-ELISA; 2) Avian reovirus isolat lokal yang berhasil dikarakterisasi dengan *western blot* memiliki komponen protein antigenik, berturut-turut dengan berat molekul 147,5; 130,6; 114,3; 74,1; 70,8; 41; 38,8 dan 31,7 kDa.

Daftar Pustaka

Astawa NM. 2006. Neutralization of avian reovirus 1091 in chick kidney and Vero cell cultures by monoclonal antibodies against μB/ μBC and σC proteins. *Media Kedokteran Hewan*. 22(2): 68-73.

de Savigny D and Voller A. 1980. The communication of ELISA data from laboratory to clinician. *J. Immunoassay*. 1(1): 105-128.

- Fenner FJ, Gibbs EPJ, Murphy FA, Rott R, Studdert MJ, and White DO. 1995. *Veterinary Virology*. Academic Press Inc, San Diego, California.
- Grande A, Costas C, and Benavente J. 2002. Subunit composition and conformational stability of the oligomeric form of the avian reovirus cell-attachment protein σ C. *J. Gen. Virol.* 83: 131-139.
- Huang DD. 1995. Restriction of avian reovirus in primary chicken embryo tendon cells. *Virology* 207(1): 117-126.
- Jones RC. 2000. Avian reovirus infection. *Rev. Sci. Tech.* 19(2): 614-615.
- Kuntz-Simon G, Gall-Recule GL, de Boisseson C, and Jestin V. 2002. Muscovy duck reovirus σ C protein is atypically encoded by the smallest genome segment. *J. Gen. Virol* 83: 1189-1200.
- Labrada L, Bodelon G, Vinuela J, and Benavente J. 2002. Avian reovirus cause apoptosis in cultured cells: Viral uncoating, but not viral gene expression, is required for apoptosis induction. *J. Virol.* 76(16): 7932-7941.
- Liu HJ, Chen JH, Liao MH, Lin MY, and Chang GN. 1999. Identification of the σ C-encoded gene of avian reovirus by nested-PCR and restriction endonuclease analysis. *J. Virol. Method.* 81(1): 83-90.
- Martinez-Costas A, Grande, Varela R, Garcia-Martinez C, and Benavente J. 1997. Protein architecture of avian reovirus S1133 and identification of the cell attachment protein. *J. Virol.* 71(1): 59-64.
- Martinez-Costas, Gonzales-Lopez JC, Vakharia VN, and Benavente J. 2000. Possible involvement of the double-stranded RNA-binding core protein σ A in the resistance of avian reovirus to interferon. *J. Virol.* 74: 1124-1131.
- Ni Y and Kemp MC. 1995. A comparative study of avian reovirus pathogenicity : virus spread and replication and induction of lesions. *Avian Dis.* 39(3): 554-566.
- Nibert ML, Margrave RL, and Coombs KM. 1996. Nonrandom segregation of parental alleles in reovirus reassortants. *J. Virol.* 70 : 7295-7300 (Abstract).
- O'Hara D, Patrick M, Cepika D, Coombs KM, and Duncan R. 2001. Avian reovirus major μ -class outer capsid protein influences efficiency of productive macrophage infection in a virus strain-specific manner. *J. Virol.* 75(11): 5027-5035.
- Olson NO. 1980. Viral Arthritis. In: *Isolation and Identification of Avian Pathogens*. The American Association of Avian Pathologists. Creative Printing Company Inc., New York. pp 85-87.
- Pertile TL, Sharma JM, and Walser MW. 1995. Reovirus infection in chickens primes splenic adherent macrophages to produce nitric oxide in response to T cell-produced factors. *Cell Immunol.* 164 (2): 207-216.
- Phillips R. 2001. *Reovirus infections in broiler breeders and progeny prevention strategies*. Schering-Plough Animal Health, New Jersey.
- Schnitzer TJ, Ramos T, and Gouvea V. 1982. Avian reovirus polypeptides: analysis of intracellular virus-specified products, virions, top component, and cores. *J. Virol.* 43(3): 1006-1014.
- Shapouri MR, Kane M, Letarte M, Bergeon J, Arella M, and Silim A. 1995. Cloning, sequencing and expression of the S1 gene of avian reovirus. *J. Gen. Virol.* 76(Pt 6): 1515-1520.
- Shmulevitz M and Duncan R. 2000. A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the nonenveloped fusogenic reoviruses. *EMBO J.* 19: 902-912.
- Shmulevitz M, Yameen Z, Dawe S, Shou J, O'Hara D, Holmes I, and Duncan R. 2002. Sequential partially overlapping gene arrangement in the tricistronic S1 genome segment of avian reovirus: implication for translation initiation. *J. Virol.* 76 (2): 609-518.
- Suwarno. 2005. Identifikasi virus rabies yang diadaptasi pada kultur sel neuroblastoma dengan indirect sandwich-ELISA dan direct-FAT. *Media Kedokteran Hewan.* 21(1): 43-47.
- Tamehiro CY, Alfieri AF, Medici KC, and Alfieri AA. 2003 Segmented double-stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. *Braz. J. Microbiol.* 34(4) Sao Paulo Oct/Dec.
- Van der Heide L. 2000. The history of avian reovirus. *Avian Dis.* 44: 638-641.
- Varela R. and Benavente J. 1994. Protein coding assignment of avian reovirus strain S1133. *J. Virol.* 68(10): 6775-6777.
- Varela R, Martinez-Costas J, Mallo M, and Benavente J. 1996. Intracellular posttranslational modifications of S1133 avian reovirus proteins. *J. Virol.* 70(5): 2974-2981.
- Wickramasinghe R, Meanger J, Enriquez CE, and Wilcox GE. 1993. Avian reovirus proteins associated with neutralization of virus infectivity. *Virology.* 194: 688-696.

- stem cell properties through downregulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood Journal* 117(2): 459-469.
- Wang J, Chen TL, Jiang J, Shi H, Gui C, Luo RH, Xie XJ, Xiang MX and Zhang X. 2008. Hypoxic preconditioning attenuates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 29(1): 74-82.
- Watt SM, Tsaknakis G, Forde SP and Carpenter L. 2009. Stem cells, hypoxia and hypoxia-inducible factors. In: Rajasekhar VK, Vemuri MC (eds.) *Regulatory Networks in Stem Cells. Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*. Humana Press.