

## ANALISIS GENETIK GEN FUSION ISOLAT NEWCASTLE DISEASE VIRUS YANG BERASAL DARI BERBAGAI WILAYAH INDONESIA

Srihanto, E.A<sup>1)</sup>, Angeliya, L<sup>1)</sup>, Guntoro, T<sup>1)</sup>, Dharmawan, R<sup>2)</sup>, Dibia, N<sup>3)</sup> dan Juwita, R.P<sup>4)</sup>

<sup>1</sup> Balai Veteriner Lampung

<sup>2</sup> Balai Besar Veteriner Water

<sup>3</sup> Balai Besar Veteriner Denpasar

<sup>4</sup> Balai Veteriner Medan

Email : eko\_dvm@yahoo.com

### ABSTRAK

Newcastle disease adalah salah satu penyakit unggas terpenting di dunia perunggasan. Penyakit ini disebabkan oleh avian paramyxovirus type 1 (APMV-1). Penelitian ini bertujuan untuk melakukan analisis genetik Newcastle diseases virus (NDV) yang berasal dari beberapa isolat di Indonesia. Data yang dihasilkan dapat sebagai acuan gambaran situasi virus ND di Indonesia saat ini. Isolat sampel berasal dari berbagai host yaitu ayam buras, ayam layer, ayam broiler dan dari lingkungan pasar tradisional. Sebanyak 9 sampel isolat yang berasal dari berbagai daerah di Indonesia dilakukan sekuensing pada gen fusion. Assembly sekuens digunakan perangkat lunak Unipro UGENE versi 1.30.0. Analisis data sekuens digunakan perangkat lunak MEGA 6.06 meliputi *multiple alignment*, *deductive amino acids prediction* dan *phylogenic tree analysis*. Analisis patogenesis didapatkan 8 isolat tergolong ke dalam velogenic ND dengan susunan asam amino penyusun *cleavage site* <sup>112</sup>R-R-Q-K-R-F<sup>117</sup>. Satu sampel isolat NDV teridentifikasi sebagai lentogenic ND yang disusun oleh asam amino <sup>112</sup>G-K-Q-G-R-L<sup>117</sup>. *Deduced amino acids sequences* pada gen fusion didapatkan 5 titik *asparagine-linked glycosylation sites* dan 12 *cysteine residues* pada isolate NDV penelitian. Titik epitop utama ditemukan relatif *conserve* kecuali pada beberapa isolate terjadi perubahan asam amino di K78R dan D170N. Analisis *phylogenetic tree* menunjukkan 8 sampel tergolong pada genotip VII (subgenotip VIIf, VIIg dan VIIh) dan 1 isolat tergolong pada genotip I.

Kata kunci: gen fusion, Newcastle disease virus, analisis phylogenetic

### PENDAHULUAN

Newcastle disease merupakan salah satu penyakit unggas yang penting di dunia perunggasan. Penyakit ini disebabkan oleh virus *avian paramyxovirus* type 1 (APMV-1). Virus ini dimasukkan ke dalam family *Paramyxoviridae* (Alexander and Senne, 2008). NDV termasuk virus RNA beramplop *non segmented*, *single-stranded* dan *negative sense*. Genom virus disusun oleh enam open reading frames (ORF) yang mengkode gen *nucleoprotein* (NP), *phosphoprotein* (P), *matrix protein* (M), *fusion protein* (F), *hemagglutinin-neuraminidase* (HN) and *RNA-dependent RNA polymerase* (L) (Chamber and Samson, 1984). NDV dikategorikan sebagai class I atau class II. NDV class I biasanya diisolasi dari unggas air liar dan unggas piaraan. NDV class I tidak virulen pada ayam. NDV class II diisolasi dari berbagai jenis unggas liar dan spesies unggas lainnya. Class I NDV dibagi menjadi 9 genotip (1–9) (Kim et al., 2007a,b; Miller et al., 2010), sedangkan class II dibagi menjadi 11 genotip (I–XI) (Czeglédi et al., 2006; Miller et al., 2010; Maminaiina et al., 2010; Tsai et al., 2004). Kebanyakan dari golongan virus ini sangat virulen dan menyebabkan kerugian yang sangat besar di industri perunggasan (Miller et al. 2009).

Penyakit ini menyebabkan kerugian ekonomi yang cukup tinggi di industri perunggasan (Alexander et al, 2012). NDV diketahui dapat menyebabkan mortalitas dan morbiditas sampai 100% atau dengan adanya penurunan produksi telur (Alexander et al, 2012; Sa'idu and Abdu, 2008). Secara nasional, ND telah dilaporkan sebagai salah satu penyakit endemis pada unggas. Laporan kasus kejadian penyakit tiap tahun ditemukan dan dilaporkan di berbagai daerah (Kencana, 2012). Perkembangan dan mutasi virus ND di lapangan sangat cepat sehingga perlu dilakukan kajian tentang dinamika virus. Informasi yang dihasilkan sangat penting dalam mempelajari evolusi virus yang ada di Indonesia. Dalam mempelajari evolusi virus ND, peranan gen Fusion sangat penting. Gen fusion sangat berperan dalam penentuan patogenesis, virulensi dan evolusi virus. Gen F berhubungan erat dengan patogenesis dan virulensi. Selain itu, gen F pada NDV juga dapat digunakan untuk melihat kedekatan antar virus (Diel et al., 2012). Penelitian ini bertujuan untuk melakukan karakterisasi virus ND isolat lapang sehingga data dan informasinya dapat digunakan sebagai acuan tentang perkembangan virus ND terkini.

## MATERI dan METODE

### Materi

Sebanyak 9 isolat NDV digunakan dalam penelitian ini. Sampel dikoleksi dari swab kloaka, swab lingkungan dan organ dari kegiatan survailans dan investigasi. Sampel berasal dari unggas jenis ayam kampung, ayam layer, ayam broiler dan lingkungan dari pasar tradisional yang dikoleksi dari tahun 2014-2017. Sampel berasal dari Aceh, Medan, Belitung, Lampung, Wates dan Denpasar (Tabel 1). Sampel diinokulasi ke *specific pathogen free* (SPF) telur ayam bertunas (TAB) umur 10 hari yang mengacu pada Terrestrial Manual Penyakit di OIE (<http://www.oie.int>). Koleksi cairan *chorio allantoic* dilakukan 24-48 jam setelah embrio mengalami kematian pasca inokulasi.

Tabel 1. Isolat yang digunakan untuk penelitian karakterisasi virus

Isolat	Host	Asal	Tahun Isolat
ND/chicken/Bireuen/BVet Medan/338	Ayam buras	Bireun	2015
ND/chicken/Lhokseumawe/BVet Medan/339	Ayam buras	Lhokseumawe	2015
ND/Environment/Medan/BVet Medan E201/2015	Lingkungan	Medan	2015
ND/Environment/Medan/BVet Medan/E203	Lingkungan	Medan	2015
ND/chicken/Belitung/BVet Lmpg/15.41/2015	Ayam layer	Belitung	2015
ND/chicken/Kulonprogo/BBVet Wates 070317/2017	Ayam broiler	Kulonprogo	2017
ND/chicken/Gianyar/BBVet Denpasar 06171189/2017	Ayam buras	Gianyar	2017
ND/chicken/Badung/BBVet Denpasar 06140948/2014	Ayam buras	Badung	2014
ND/chicken/Tanggamus/031711087/2017	Ayam breeder	Tanggamus	2017

Ekstraksi RNA sampel digunakan kit Qiamp RNA extraction kit (Qiagen cat. No 157022202). Cara kerja ekstraksi menurut langkah kerja yang disusun oleh perusahaan. Identifikasi dilakukan dengan metode qRT-PCR menggunakan primer-probe dari AAHL Geelong Australia. Amplifikasi RT-PCR sampel untuk sekuensing digunakan primer forward dan reverse dengan kode ND RI, ND RII, ND RIII dan ND RIV (Tabel 2). Amplifikasi sampel digunakan SuperScrip III One Step RT-PCR Platinum Taq HiFi (Invitrogen cat. No 12574-030). Amplifikasi PCR digunakan program 35 siklus dengan suhu 95°C selama 15 detik, 55°C selama 45 detik dan 68°C selama 60 detik.

Tabel 2. Susunan sekuens primer forward dan reverse yang digunakan untuk sekuensing

Primer	Sekuens	Produk (bp)	Posisi
ND RI F	AGAGTGTGGATCCCAACCAG	360	4513 - 4532
ND RI R	GTGGATACAGACCCTTGAATCTTG		4849 - 4872
ND RII F	GCAGGGATTGTAGTAACAGGAGAT	733	4667 - 4690
ND RII R	CCAAGAGTTGAGTCTGTGAGTCAT		5376 - 5399
ND RIII F	ACTACAGTGTTCGGGCCACA	656	5201 - 5220
ND RIII R	AGCCTCAGAGTTATCCCGTCTAAT		5833 - 1307
ND RIV F	GTTTGAGCGGCAACACATC	704	5634 - 5652
ND RIV R	GTTCTACCCGTGATTGCTCTTTG		6314 - 6337

## Metode

Analisis data dilakukan dengan melihat jarak genetik, homologi, *deduced amino acids* pada daerah *cleavage site*, *glycosylation site*, *cysteine residue*, *antigenic site* dan *phylogenetic tree analysis*. Analisis hasil sekuens dilakukan terhadap full gen Fusion. Assembly asam nukleat hasil sekuensing digunakan perangkat lunak Unipro UGENE versi 1.30.0. *Phylogenetic analysis* dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak MEGA versi 6.06 (Tamura et al., 2013). Sekuens hasil analisis dibandingkan dengan 76 sekuens gen F virus ND lainnya (genotip I-IX) yang sudah terdaftar di GenBank. Analisis *phylogenetic* digunakan metode *Maximum Likelihood* (Tamura and Kumar, 2012) dengan penghitungan standard berdasarkan 500 *bootstrap replicates* (Diel et al. 2012).

## HASIL

Amplifikasi gen F NDV dihasilkan 1662 asam nukleat yang menyandi 553 asam amino. Sebanyak sembilan sampel isolat NDV dari berbagai daerah dan berbagai hospes digunakan sebagai penelitian. Pada gen F NDV ditemukan 6 (enam) *asparagine-linked glycosylation sites*. Lima daerah *asparagine-linked glycosylation sites* (posisi 85, 191, 366, 447 dan 471) ditemukan relatif *conserve* (Tabel 3). Perubahan susunan asam amino glikosilasi terjadi pada posisi 497-499. Konsensus asam amino glikosilasi pada posisi 497-499 adalah NTS. Pada isolat penelitian terjadi perubahan asam amino menjadi STS.

Tabel 3. Susunan asam amino di *glycosylation site*

Isolat	Susunan Asam Amino pada daerah glikosilasi					
	85-87	191-193	366-368	447-449	471-473	497-499
Konsensus	NRT	NNT	NTS	NVS	NNS	NTS
ND/chicken/Bireuen/BVet Medan/338	*	NKT	*	NIS	*	STS
ND/chicken/Lhokseumawe/BVet Medan/339	*	*	*	NIS	*	STS
ND/Environment/Medan/BVet Medan E201/2015	*	*	*	NIS	*	STS
ND/Environment/Medan/BVet Medan/E203	*	*	*	NIS	*	STS
ND/chicken/Belitung/BVet Lmpg/15.41/2015	*	*	*	NIS	*	STS
ND/chicken/Kulonprogo/BBVet Wates 070317/2017	*	*	*	NIS	*	STS
ND/chicken/Gianyar/BBVet Denpasar 06171189/2017	*	*	*	NIS	*	STS
ND/chicken/Badung/BBVet Denpasar 06140948/2014	*	*	*	NIS	*	STS
ND/chicken/Tanggamas/031711087/2017	*	*	*	NIS	*	STS

Pada gen F NDV ditemukan 13 (tiga belas) posisi *cysteine residue*. Sebelas posisi *cysteine residues* (posisi 76, 199, 338, 347, 362, 370, 394, 399, 401, 424 dan 523) isolat penelitian terlihat relatif *conserve* (Tabel 4). Perubahan asam amino *cysteine residue* terjadi pada asam amino posisi 25 dan 514. Variasi perubahan asam amino pada posisi 25 berubah menjadi asam amino Y, P, F, W (C25Y/P/F/W). Posisi asam amino ke-514 mengalami perubahan menjadi asam amino F (C514F). Isolat ND/Environment/Medan/BVet Medan E201/2015 pada posisi 514 tidak mengalami perubahan.

Tabel 4. *Cysteine residue* pada gen F

Isolat	Cysteine Residu gen F												
	25	76	199	338	347	362	370	394	399	401	424	514	523
Konsensus	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
ND/chicken/Bireuen/BVet Medan/338	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	F
ND/chicken/Lhokseumawe/BVet Medan/339	P	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	F
ND/Environment/Medan/BVet Medan E201/2015	F	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ND/Environment/Medan/BVet Medan/E203	F	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	F
ND/chicken/Belitung/BVet Lmpg/15.41/2015	F	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	F
ND/chicken/Kulonprogo/BBVet Wates 070317/2017	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	F
ND/chicken/Gianyar/BBVet Denpasar 06171189/2017	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	F
ND/chicken/Badung/BBVet Denpasar 06140948/2014	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	F
ND/chicken/Tanggamas/031711087/2017	W	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	F

Lima daerah netralisasi epitop ditemukan pada gen Fusion NDV. Lokasi netralisasi epitop terletak pada posisi A1 (72), A2 (78), A3 (79), A4 (157-171) dan A5 (343). Asam amino di daerah netralisasi epitop cenderung relatif *conserve* (Tabel 5). Perubahan asam amino terjadi pada beberapa isolat penelitian di posisi A2 (78) dan A4 (170). Perubahan asam amino yang ditemukan adalah K78R dan D170N.

Tabel 5. Susunan asam amino epitop pada gen F

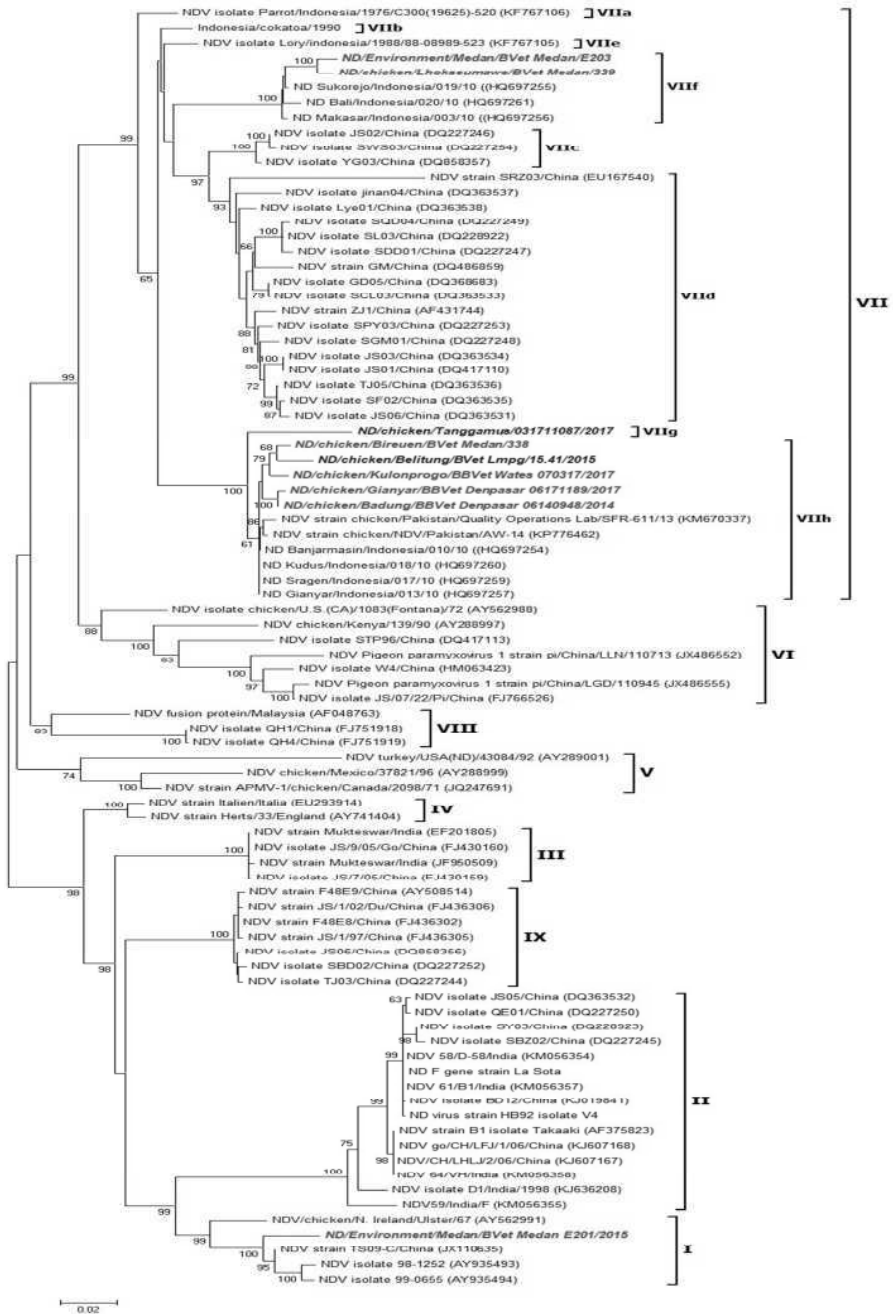
Isolat	Residu Asam Amino pada daerah Epitop gen F																		
	A3			A4													A5		
	A1	A2	A3	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	A5
Konsensus	72	78	79	S	T/I	A	A	T	N	E	A	V	H	E	V	T	D	G	L
ND/chicken/Bireuen/BVet Medan/338	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ND/chicken/Lhokseumawe/BVet Medan/339	*	R	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	*	*
ND/Environment/Medan/BVet Medan E201/2015	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	*	*
ND/Environment/Medan/BVet Medan/E203	*	R	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	*	*
ND/chicken/Belitung/BVet Lmpg/15.41/2015	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ND/chicken/Kulonprogo/BBVet Wates 070317/2017	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ND/chicken/Gianyars/BBVet Denpasar 06171189/2017	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ND/chicken/Badung/BBVet Denpasar 06140948/2014	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ND/chicken/Tanggarnus/031711087/2017	*	R	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Sebagian besar isolat NDV menunjukkan virulensi tinggi (Tabel 6). Salah satu isolat asal Medan yang berasal dari lingkungan pasar tradisional teridentifikasi sebagai avirulen NDV. Asam amino yang menyusun cleavage site beberapa isolat ditemukan adanya 2 jenis motif yaitu <sup>112</sup>RRRKRF<sup>117</sup> dan <sup>112</sup>RRQKRF<sup>117</sup>. Semua isolat tersebut diklasifikasikan sebagai velogenic NDV. Satu isolat dari Medan (ND/Environment/Medan/BVet Medan/339) digolongkan ke dalam lentogenic NDV. Asam amino pada cleavage site disusun oleh asam amino <sup>112</sup>GKQGRL<sup>117</sup>.

Tabel 6. Susunan asam amino pada cleavage site, patogenesisitas dan genotip sampel

Isolat	Asam amino pada cleavage site	Patogenesisitas	Genotipe
ND/chicken/Bireuen/BVet Medan/338	RRQKRF	Velogenic	VIIh
ND/chicken/Lhokseumawe/BVet Medan/339	RRQKRF	Velogenic	VIIIf
ND/Environment/Medan/BVet Medan E201/2015	GKQGRL	Lentogenic	I
ND/Environment/Medan/BVet Medan/E203	RRRKRF	Velogenic	VIIIf
ND/chicken/Belitung/BVet Lmpg/15.41/2015	RRQKRF	Velogenic	VIIh
ND/chicken/Kulonprogo/BBVet Wates 070317/2017	RRQKRF	Velogenic	VIIh
ND/chicken/Gianyar/BBVet Denpasar 06171189/2017	RRQKRF	Velogenic	VIIh
ND/chicken/Badung/BBVet Denpasar 06140948/2014	RRQKRF	Velogenic	VIIh
ND/chicken/Tanggamus/031711087/2017	RRQKRF	Velogenic	VIIg

Jarak genetik dan homologi virus sesama strain velogenic sekitar 93-100% sehingga masih diklasifikasikan dalam satu grup genotip. Satu isolat yang berasal dari Medan mempunyai jarak genetik sebesar 11%. Gambaran phylogenetic analysis diidentifikasi beberapa isolat termasuk ke dalam genotype VII. Pada genotype VII ini, isolate NDV teridentifikasi ke dalam subgenotipe VIIIf, VIIg dan VIIh (Gambar 1). Satu isolate yang berasal dari Medan diidentifikasi ke dalam genotip I.



Gambar 1. Analisis phylogenetic virus ND isolat Indonesia.

## PEMBAHASAN

Virus ND di Indonesia sudah menyebabkan penyakit endemic pada unggas (Darminto dan Saefulloh, 2005). Sejauh ini penanggulangan wabah ND dilakukan dengan program vaksinasi namun sampai sekarang wabah ND tetap menjadi masalah yang serius di industry peternakan ayam. Sesuai dampak yang ditimbulkan maka Newcastle disease merupakan salah satu penyakit unggas yang termasuk daftar A oleh Office International des Epizooties (OIE) (Alaxander, 2000). Kajian tentang virus ND dilakukan untuk mempelajari dan mendapatkan data tentang sebaran virus ND di Indonesia. Kajian penelitian digunakan gen Fusion dimana gen ini menyandi tentang *cleavage site*, *epitope*, *antigenic site* dan *genotyping*.

Sebaran virus ND di Indonesia mayoritas didominasi oleh ND golongan velogenik. Sebagian kecil virus ND di Indonesia teridentifikasi sebagai NDV lentogenik. Golongan NDV velogenik ditemukan dari sebagian besar kasus ND di lapangan. Sebaran virus ND lentogenik ditemukan di pasar tradisional. Hal ini menandakan bahwa pasar tradisional merupakan salah satu tempat yang mempunyai resiko pencampuran berbagai macam agen penyakit (Loth et al., 2011). Di Indonesia golongan velogenik NDV diklasifikasikan ke dalam genotip VII. Sampai saat ini genotip VII di Indonesia sudah teridentifikasi sampai VIIIh.

Daerah *C-residue*, *epitope* dan glikosilasi cenderung *conserve*. Posisi tersebut mempunyai hubungan erat dengan respon antibody dan virulensi virus. Perubahan pada glikosilasi site akan mempengaruhi virulensi dari virus. Perubahan tersebut perlu dipelajari untuk mempelajari hubungan virus dengan respon vaksin yang digunakan. Hal ini dilakukan karena vaksinasi masih digunakan sebagai salah satu program pengendalian penyakit.

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan :

1. Virus ND yang bersirkulasi di Indonesia teridentifikasi sebagai velogenic dan lentogenic ND
2. Susunan asam amino yang menyusun *cleavage site* teridentifikasi <sup>112</sup>RRRKRF<sup>117</sup>, <sup>112</sup>RRQKRF<sup>117</sup> dan <sup>112</sup>GKQGRL<sup>117</sup>.
3. Secara genotip NDV di Indonesia teridentifikasi sebagai genotip I, VIIf, VIIg dan VIIIh.



## DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, D.J., Aldous, E.W. and Chad, M.F. 2012. The long view: A selected review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathol.*, 41: 329-335
- Chambers, P, Samson, A.C., 1982. Non-structural proteins in Newcastle disease virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 58 (Pt 1), 1–12.
- Czeglédi, A., Ujvári, D., Somogyi, E., Wehmann, E., Werner, O., Lomniczi, B., 2006. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Res.* 120 (1–2), 36–48.
- Diego G. Diel, Luciana H.A. da Silva, Hualei Liu, Zhiliang Wang, Patti J. Miller, Claudio L. Afonso. 2012. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: Proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infection : Genetics and Evolution* 12 : 1770–1779
- Kencana, G.A.Y. 2012. Penyakit Virus Unggas. Udayana University Press, Denpasar : pp. 30-40
- Kim, L.M., King, D.J., Curry, P.E., Suarez, D.L., Swayne, D.E., Stallknecht, D.E., Slemons, R.D., Pedersen, J.C., Senne, D.A., Winker, K., Afonso, C.L., 2007a. Phylogenetic diversity among low-virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. *J. Virol.* 81 (22), 12641–12653.
- Kim, L.M., King, D.J., Suarez, D.L., Wong, C.W., Afonso, C.L., 2007b. Characterization of class I Newcastle disease virus isolates from Hong Kong live bird markets and detection using real-time reverse transcription–PCR. *J. Clin. Microbiol.* 45 (4), 1310–1314.
- Mayo, M.A. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol* 147 (8) : 1655–63
- Loth Leo, Gilbert Marius, Wu Jianmei, Czarnecki Christina, Hidayat Muhammad and Xiao Xiangming. 2011. Identifying risk factors of highly pathogenic subtype) avian influenza H5N1 in Indonesia. *Preventive Veterinary Medicine* 102 : 50-58

- Maminiaina, O.F., Gil, P., Briand, F.-X., Albina, E., Keita, D., Andriamanivo, H.R., Chevalier, V., Lancelot, R., Martinez, D., Rakotondravao, R., Rajaonarison, J.J., Koko, M., Andriantsimahavandy, A.A., Jestin, V., Servan de Almeida, R., 2010. Newcastle disease virus in Madagascar: identification of an original genotype possibly deriving from a died out ancestor of genotype IV. *PloS One* 5 (11), e13987.
- Miller, P.J., Estevez, C., Yu, Q., Suarez, D.L and King, D.J. 2009. Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. *Avian Dis* 53 (1) : 39–49
- Miller, P.J., Decanini, E.L., Afonso, C.L., 2010. Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infect. Gen. Evol.* 10 (1), 26–35.
- Sa'idu, L. and Abdu, P.A. 2008. Outbreak of viscerotropic velogenic form of Newcastle disease in vaccinated six weeks old pullets. *Sokoto J. Vet. Sci.*, 7: 37-40.
- Steward, M., Vipond, I., Millar, N. and Emmerson, P. 1993. RNA editing in Newcastle disease virus. *J Genet Virol* 74 (12) : 2539–2547
- Subrat N. Rout. 2007. THE ROLE OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS INTERNAL PROTEINS IN PATHOGENESIS. Dissertation submitted to the Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, College Park, in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary distance, and Maximum Parsimony Methods, *Mol. Biol. Evol.* 28 (10) : 2731–2739. doi:10.1093/molbev/msr121 : 1-9
- Tsai, H.-J., Chang, K.-H., Tseng, C.-H., Frost, K.M., Manvell, R.J., Alexander, D.J., 2004. Antigenic and genotypical characterization of Newcastle disease viruses isolated in Taiwan between 1969 and 1996. *Vet. Microbiol.* 104 (1–2), 19–30.