

PENGARUH PERKEMBANGAN SISTEM PRODUKSI AYAM TERHADAP PERUBAHAN GENETIK DAN BIOLOGIK VIRUS *NEWCASTLE DISEASE*

SUDARISMAN

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R.E. Martadinata No. 30, Bogor 16114

(Makalah diterima 10 Juni 2009 – Revisi 16 September 2009)

ABSTRAK

Banyak negara telah menyatakan bahwa *Newcastle Disease* (ND) merupakan salah satu penyakit penting pada unggas dan telah menyebabkan kerugian yang sangat besar pada industri peternakan unggas. ND atau *pseudo-fowl-pest*, merupakan penyakit viral yang sangat menular dan menyebabkan kematian yang sangat tinggi (hampir dari 100% di daerah yang sangat endemik) pada unggas dan burung liar di dunia. ND tetap endemik di banyak negara dan terus berlangsung, sehingga menghambat produksi peternakan ayam pada negara yang sedang berkembang seperti Indonesia. Penyakit tersebut kini dikendalikan dengan program vaksinasi di banyak negara. Tetapi laporan menunjukkan masih terjadi wabah pada unggas yang telah mendapatkan program vaksinasi di lapang. Hal ini mungkin tidak hanya disebabkan oleh perbedaan dalam antigenisitas dari virus ND di lapang dan galur vaksin yang digunakan, tetapi juga oleh perbedaan dalam patogenitas dan virulensi galur yang dipakai sebagai bahan dasar vaksin ND.

Kata kunci: Virus *Newcastle Disease*, perubahan biologik, perubahan genetik, ayam

ABSTRACT

GENETIC AND BIOLOGICAL CHANGES OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS DUE TO THE DEVELOPMENT OF CHICKEN PRODUCTION SYSTEM

In many countries, Newcastle Disease (ND) is one of the most important diseases of poultry. It causes serious economic losses in poultry industry. Newcastle Disease or pseudo-fowl pest is a highly infectious viral disease that causes very high mortality (up to 100% in severe epidemics) in poultry and wild birds around the world. Newcastle Disease remains endemic in many regions and continues to severely limit poultry production in some developing countries. The disease is currently being controlled by routine vaccinations in many countries. However, it was reported that outbreaks of ND in vaccinated flocks often occur on the field may not only be due to differences in the antigenicity of the NDV wild field strains and vaccine strains, but could also be as a result of differences in pathogenicity and virulence between different strains used as vaccine seed in NDV vaccine production.

Key words: Newcastle Disease virus, biological changes, genetic changes, chicken

PENDAHULUAN

Newcastle Disease (penyakit ND, tetelo) merupakan penyakit virus yang sangat menular, menyerang unggas liar maupun ayam (SEAL *et al.*, 2000; ALEXANDER, 2001). Berhubung kepekaan ayam terhadap ND sangat tinggi, dampaknya sangat terasa apabila terjadi wabah dari jenis yang sangat *virulent* dari virus ND. Kenyataannya telah menjadi polemik bahwa ND merupakan penyakit yang paling ditakuti pada peternakan ayam ras, walaupun kini ada penyakit *Avian Influenza* (AI) yang mungkin dampaknya lebih luas karena bersifat zoonosis (ALEXANDER, 2001).

Di Indonesia, ND masih merupakan penyakit berbahaya yang harus selalu diawasi perkembangannya. Wabah penyakit ND pada ayam di Australia bagian

New South Wales pada tahun 1998, 1999 dan 2000 sangat mengejutkan, terutama karena negara tersebut merupakan negara yang telah lama memiliki galur *avirulent* dan telah terdeteksi pada tahun 1966 (WESTBURY, 2001). Selama dua atau tiga dekade, hanya ditemukan galur *lentogenic* dari ND yang hanya menyebabkan penyakit respirasi ringan, demikian pula galur *Lasota* yang ditemukan di negara tersebut merupakan galur vaksin. Sampai kini, Australia masih memproklamkan diri sebagai negara yang bebas ND, sehingga ND pada negara tersebut merupakan penyakit eksotik (*exotic disease*).

Kejadian penyakit ND di Australia tersebut di atas merupakan pelajaran bagi kita bahwa penyakit ND dapat pula berubah bentuk dari bentuk *lentogenic* menjadi bentuk ganas (*velogenic*) yang menyebabkan

kematian pada ayam. Hal yang menarik adalah agen virus yang diisolasi secara biologi molekuler ternyata relatif sama dan bukan merupakan virus ND galur luar. Akan tetapi dengan melihat adanya peningkatan *intra cerebral pathogenicity index* (ICPI) dari 0,41 (*Peat's Ridge Isolate/1998*) menjadi 1,60 – 1,70 pada *Dean Park Isolate* (dua bulan kemudian) dan menjadi 1,70 – 1,80 untuk *Mangrove Mount Isolate* (1999). Kemudian pada tahun 2000 di utara Sydney muncul lagi *virulent ND* yang secara klinis jelas ND ganas, sehingga perlu dilakukan pendekatan biologi molekuler pada penyakit ND. Keseluruhan isolat yang tersebut di atas relatif sama *phylogenetic*-nya ketika *gene* HN dan *gene* F dari seluruh isolat dianalisis dan hal ini merupakan pertanyaan yang perlu dikaji pada masa-masa mendatang (WESTBURY, 2001).

Tujuan penulisan artikel ini adalah membandingkan kejadian ND di lapang dengan kejadian ND di luar negeri. Disamping itu, adanya pengaruh perubahan sistem produksi ayam terhadap perubahan genetik dan biologik virus ND dan kejadian penyakit serta seluk beluk penanggulangannya di Indonesia.

PERKEMBANGAN AYAM RAS

Terjadi perubahan yang sangat besar dalam metode beternak ayam petelur di dunia dibandingkan dengan komoditi lainnya dalam bidang pertanian dalam kurun waktu tidak lebih dari tiga puluh tahun (SAINSBURY, 1987). Kini, peternakan ayam petelur sangat intensif sehingga produktivitas sangat tinggi karena sistem manajemen dan cara beternak ayam dengan waktu yang relatif singkat.

Menurut SAINSBURY (1987) pada tahun 1960 hasil telur tercatat 185 butir/ekor/tahun sedangkan pada dua dekade terakhir ini mencapai 243 butir dalam satu tahun per ekor petelur. Juga pada 50 tahun yang lalu lebih dari 30% petelur dternakkan dalam kebun dan hanya 19% di kandang. Pada dua dekade terakhir ini peternakan ayam petelur menjadi 93% dalam kandang dan hanya 3% beternak di kebun. KNAP dan BISHOP (2008) menyatakan bahwa ada hubungan antara perubahan genetik dan kejadian penyakit pada ayam. Dalam kesimpulannya dinyatakan bahwa: i). Potensi genetik ayam dengan sistem kekebalan dapat diubah dengan pemuliaan, ii) Sistem kekebalan ayam dipengaruhi oleh potensi produksi, kombinasi dengan sumber lingkungan yang menunjangnya, iii) Status penyakit dipengaruhi oleh sistem kekebalan yang dimiliki, dan iv) Tingkat produksi ayam juga dipengaruhi oleh sistem kekebalan yang ada. Oleh sebab itu, masih banyak pertanyaan yang berkaitan dengan meningkatnya produksi ternak ayam, terutama ternak ayam ras. Apakah fenomena ini berpengaruh negatif terhadap perkembangan penyakit pada ayam

tersebut, atau apakah sebaliknya, masih perlu penelitian lebih lanjut.

Di Indonesia, perkembangan cara beternak ayam jenis ayam lokal terlihat tidak begitu banyak perubahannya, walaupun sebagian kecil telah memulai beternak secara intensif dan dikandangkan setiap hari serta diberi pakan secara teratur layaknya ayam ras. Akan tetapi peternak komersial, terutama untuk ayam ras begitu jauh berkembang dan hal ini yang merupakan titik permasalahan yang harus dianalisis apakah sistem perkembangan beternak ayam yang dilakukan sudah sesuai dengan kejadian serta penanggulangan penyakit yang selama ini telah ada, khususnya penyakit ND. Perlu dikaji ulang dengan seksama, apakah program vaksinasi yang telah diterapkan tidak memberikan masalah lain, terutama dalam sifat biologik virus penyebab penyakit ND yang telah lama ada di Indonesia.

PERKEMBANGAN PARAMYXOVIRUS

Virus ND diklasifikasikan sebagai superfamili dari *Mononegavirales* dalam famili *Paramyxoviridae*, genus *Avulavirus* (MAYO, 2002a; b). Galur ND terdiri dari 10 grup genetik (I – X) dan dibagi lagi ke dalam subgenetik (VI a hingga VI h dan VII a hingga VII e). Secara serologi, virus ND terdiri dari satu (*single*) grup, avian *paramyxovirus* 1. Virusnya merupakan *negative single stranded-genome* RNA dengan 15.186 kb (SEAL *et al.*, 2000), dengan kode RNA langsung adalah *RNA Polymerase*, *Hemagglutinin-neuraminidase protein*, *fusion protein*, *matrix protein*, *phosphoprotein* dan *nucleoprotein*.

Isolat yang dikategorikan sebagai virulen untuk ayam ada tiga patotipe utama tergantung keparahan dari penyakit. Isolat *lentogenic* adalah isolat yang paling rendah virulensinya, sedangkan virus dengan virulensi *intermediate* adalah *mesogenic*. Virus dengan virulensi tertinggi menyebabkan mortalitas yang tinggi pada ayam digolongkan ke dalam *neurotropic* atau *viscerotropic*. Virus ND *velogenic* adalah virus yang dikategorikan sebagai patogen List A dalam pedoman OIE dan kejadiannya harus dilaporkan. OIE mendefinisikan ND sebagai infeksi yang disebabkan oleh virus APMV-1 dengan indeks ICPI 0,7 atau lebih besar bila disuntik pada ayam umur sehari (OIE, 2000). Virus ND memiliki dua pasang asam amino dasar, yaitu *Lysine* (K) atau *Arginine* (R) pada *Fusion protein* pada residu 112 hingga 113 dan 115 hingga 116, seperti juga *Phenylalanine* pada residu 117 (GLICKMAN *et al.*, 1988; NAGAI *et al.*, 1976; PETERS *et al.*, 1997).

Gene Matriks (M) menurut SEAL *et al.* (2000) ternyata mengalami perubahan sejak 1970 di Amerika. Hal ini karena adanya perubahan yang terjadi pada asam amino dari protein M yang berhubungan dengan *phylogenetic relationship*. WEI PING *et al.* (2005)

dalam penelitiannya menggunakan 14 isolat virus virulen APMV-1 yang berasal dari unggas, merpati, angsa, burung puyuh, merpati jambul, merak dan jenis unggas lainnya. Isolat virus ini dievaluasi melalui metode uji dengan parameter *mean death time* (MDT) dan ICPI. N-terminal dari F-gene dan C-terminal dari HN-gene diisolasi dan diuji dengan PCR, *sequencing* dan dianalisis terhadap hubungan genetiknya dengan menggunakan *alignment* dan konstruksi *phylogenetic tree*. Hasil menunjukkan bahwa MDT isolat mulai dari 36 jam hingga 75 jam, dan ICPI 1,09 sampai 1,95, kecuali isolat gpx 22 dengan ICPI adalah 0 (nol). Nilai ICPI lebih terpercaya dibandingkan dengan *Intra Venous Pathogenicity Index* (IVPI) ataupun *cloacal inoculation* untuk menyatakan apakah isolat virus itu virulen atau tidak.

Rangkaian asam amino dari F protein pada *cleavage site* semua isolat memiliki persamaan *terminal codon C-terminus* dari HN-gene seperti virus *reference virulent strain* F48E8 dan HER/33. *Phylogenetic tree* yang didasari pada rangkaian nukleotida F-gene, sama seperti *subgenotype* VIII virus yang menyebabkan wabah di Guang Xi, RRC baru-baru ini. Sedangkan, HN-gene memperlihatkan semua isolat diklasifikasikan ke dalam dua grup. Patogenisitas dari APMV-1 secara *in vivo* dapat diketahui dengan identifikasi karakteristik dari F-gene dan HN-gene secara *in vitro*. Demikian pula yang terjadi di Amerika, telah terdokumentasi bahwa virus-virus yang biasanya tidak ganas berubah menjadi virus ganas melalui mutasi.

Phylogenetic relationship dari ND telah dipelajari dari isolat-isolat burung liar, terutama burung air (*waterfowl bird*) di daerah New-Jersey, Delaware, dan Maryland pada periode tahun 2000 – 2004 (AFONSO, 2006). *Sequencing* dan fusi dari *gene-gene* protein inti dari NDV tersebut menunjukkan bahwa virus-virus asal isolat tersebut ada hubungannya dengan *lineage-1* dan 6 dari *strain lentogenic*. Melalui data yang ada menunjukkan lebih dari satu *lineage* (dan *sublineage*) berputar secara terus menerus di daerah yang sama, virus- virus tersebut mampu menginfeksi banyak jenis-jenis burung liar di tempat tersebut.

Virus-virus dari *lineage* keduanya sangat dekat hubungannya dengan yang kini diidentifikasi di Eropa, Asia Timur dan Asia Selatan. Virus-virus dari *lineage* 6 berhubungan dengan virus lentogenik yang didapat pada pasar burung di Amerika. Di Taiwan (YANG *et al.*, 2007), virus ND velogenik ditandai dengan *sequence* ¹¹²R-R-K-K-R¹¹⁶ untuk F-protein dan merupakan grup isolat VIIId. Isolat Indonesia, hingga kini masih dalam kelas II grup VII (PEROZO *et al.*, 2008), akan tetapi masih belum banyak dipelajari walaupun isolat-isolat ND yang dimiliki sudah

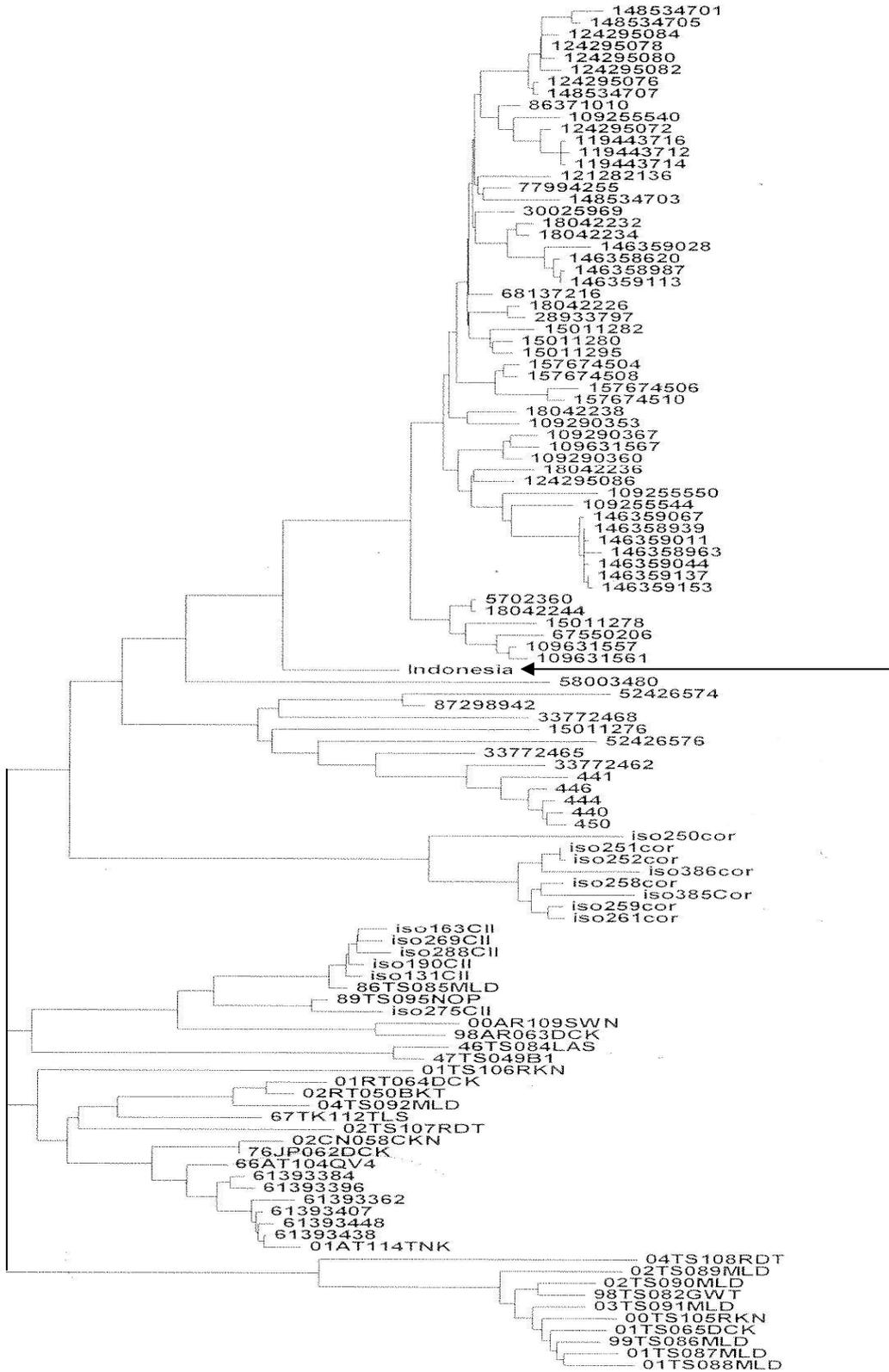
merupakan grup VII (Gambar 1 dan 2). Analisis sementara masih memperlihatkan grup VII d, dalam klasifikasi ini Indonesia sejak 1990 hingga 2006 masih mencerminkan virus *highly virulent velogenic viscerotropic* yang tentu berbeda seperti yang kita duga sebelumnya berupa *velogenic neurotropic*, tentu hal ini masih perlu dibuktikan lebih banyak lagi dengan sejumlah isolat yang kita miliki.

PENDEKATAN BIOLOGI MOLEKULER

Di Korea, program vaksinasi secara intensif telah dilakukan dan penggunaan vaksin ND setiap tahunnya makin lama makin meningkat (JEON *et al.*, 2008). Akan tetapi, wabah ND pada peternakan yang telah divaksinasi juga tetap terjadi, sehingga kerugian ekonomi tidak terelakkan terutama produksi telur yang terus menurun. Timbul pertanyaan tentang variasi antigenik dari vaksin ND dan dipertanyakannya vaksin konvensional ND yang bersifat menurunkan produksi telur. Oleh sebab itu, analisis *phylogenetic* diperlukan segera untuk menjawab pertanyaan di atas tentang tidak efektifnya vaksin konvensional, terutama dalam rangka menjaga produksi telur yang stabil.

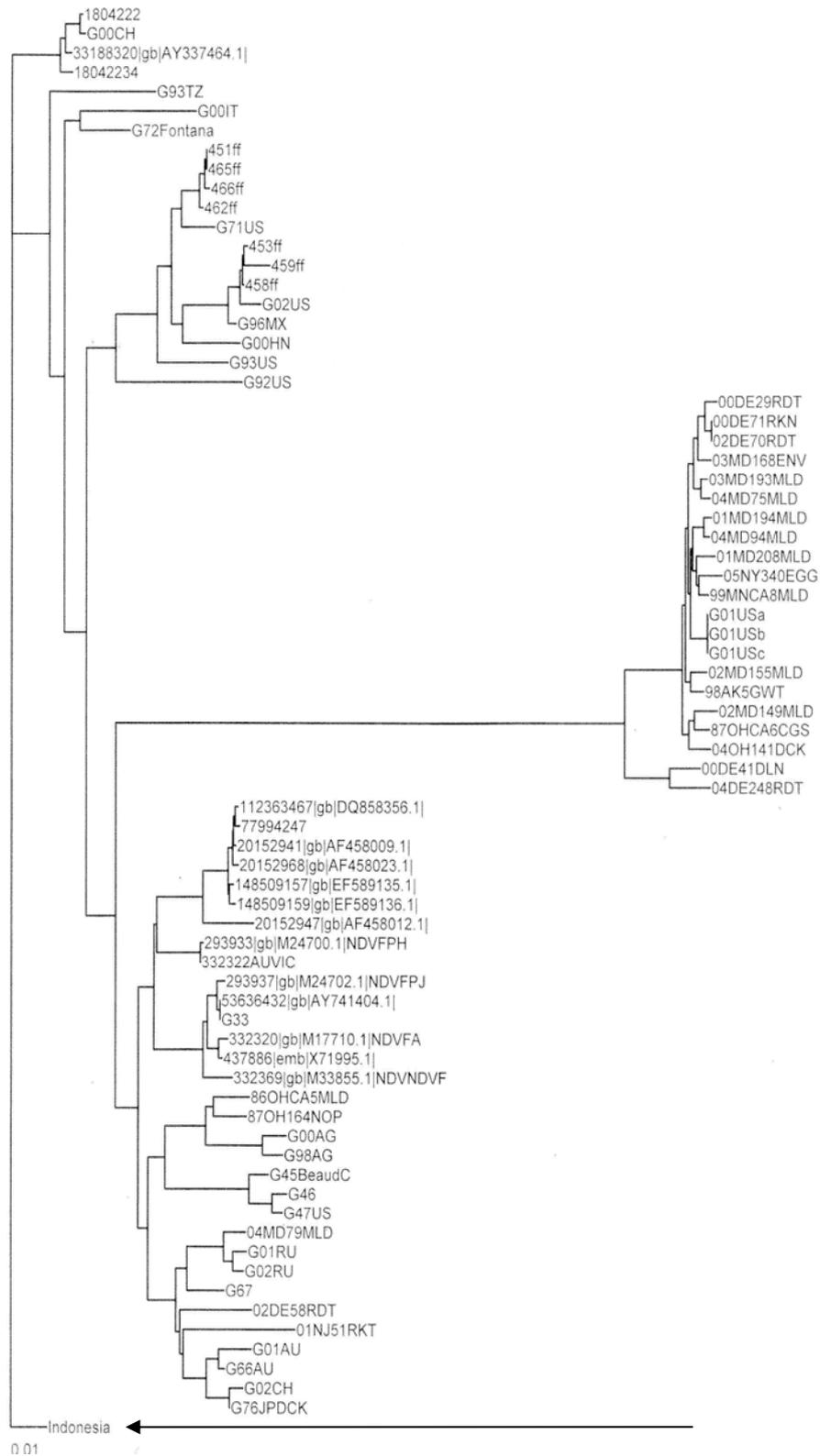
Di Hungaria, melalui *gene fusion* protein untuk melihat genotipe dari 47 isolat *strain* virus ND mulai tahun 1959 hingga tahun 1996, virus isolat terbagi ke dalam lima genotipe utama, yaitu genotipe II, IV, V, VI, dan subgenotipe VII b. Epizootik ND di Bulgaria merupakan infeksi gabungan, yaitu lebih dari satu genotipe dalam satuan waktu kasus (CZEGLEDI *et al.*, 2002). Di Korea, antigenisitas dari varian ND sangat dominan dan berbeda dengan yang lainnya dari tipe liar (CHO *et al.*, 2008). Di Korea, isolat asal tahun 2000 hingga tahun 2006 dapat diletakkan dalam satu subgenotipe VII d.

Proteksi kekebalan pada ayam melibatkan berbagai respons yang hingga kini belum diketahui secara sempurna. Apabila isolat genotipe VII digunakan sebagai bahan untuk pembuatan vaksin, maka vaksin yang digunakan akan menimbulkan kekebalan yang penuh terhadap ND yang disebabkan oleh virus lapang dari genotipe VII, terbukti tidak ada mortalitas yang muncul, demikian pula gejala klinis penyakit tidak terlihat sama sekali (JEON *et al.*, 2008). Bahkan vaksin ini akan memberikan proteksi, apabila ditantang dengan virus genotipe III (Kr-KJW/49). Hal ini seiring dengan yang telah dikemukakan oleh LIU *et al.* (2003) yang menyatakan ayam yang divaksinasi dengan galur La Sota akan menimbulkan kekebalan yang penuh bila ditantang dengan galur heterogen ND dan genotipe yang berbeda.



Gambar 1. Phylogenetic relationship antara isolat Indonesia dan isolat ND lainnya di dunia

Sumber: SUDARISMAN (2009)



Gambar 2. *Phylogenetic relationship* antara isolat Indonesia dan isolat ND lainnya di dunia

Sumber: SUDARISMAN (2009)

KEJADIAN PENYAKIT DI LAPANG

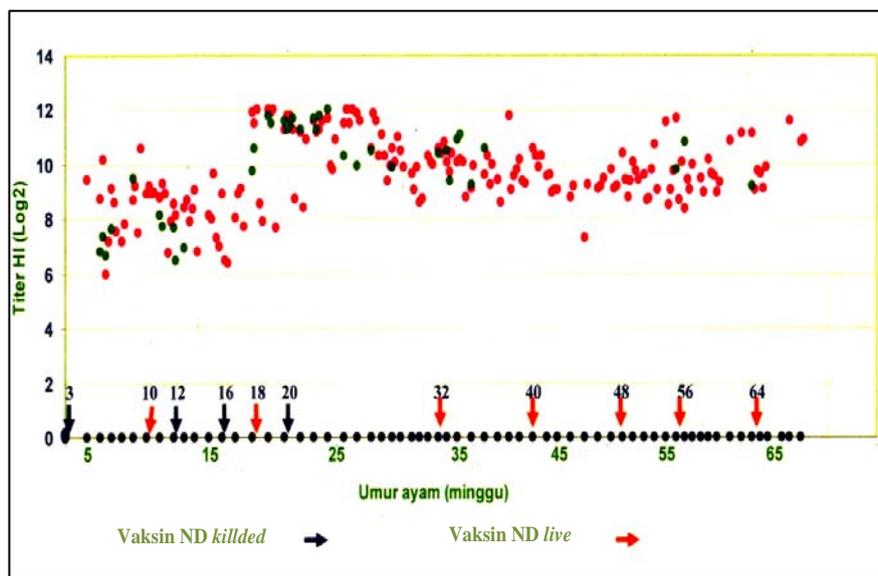
Hingga kini ND masih merupakan penyakit endemis di beberapa wilayah di Indonesia. Berdasarkan laporan Dinas Peternakan, kejadian yang menonjol di Indonesia hingga kini adalah ND merupakan penyakit yang sangat patogen dan tingkat mortalitasnya masih juga tinggi pada peternakan ayam sektor 4. Secara umum, ND mengakibatkan depresi, diare, *prostration*, oedema kepala dan pial, gejala syaraf, seperti paralysis dan tortikolis, dan gangguan pernafasan (MCFERRAN dan MCCRACKEN, 1988). Turunnya produksi telur, diawali dengan hambatan produksi telur, bisa juga diawali dengan tanda klinis dan kematian pada ayam yang sedang bertelur. Galur virus ganas mungkin masih bereplikasi pada ayam yang divaksinasi, tetapi tanda klinis sering tidak kelihatan dalam hubungannya dengan tingkat kekebalan yang dicapai (ALLAN dan LANCASTER, 1978). Tidak ada gejala patologik yang patognomonis (MCFERRAN dan MCCRACKEN, 1988). Perubahan patologi anatomik yang terlihat nyata biasanya ada perdarahan pada saluran pencernaan terutama proventrikulus, pada permukaan mukosanya terlihat bintik-bintik merah dan perdarahan pada beberapa organ dalam seperti limpa, jantung, indung telur, dan beberapa organ lainnya.

Pada peternakan yang telah menjalankan program vaksinasi dengan baik, tetapi masih terserang ND, biasanya terjadi penurunan produksi telur seiring dengan perubahan titer zat kebal dengan uji HI (*Haemagglutination Inhibition*). Hal ini menimbulkan polemik bagaimana cara terbaik untuk mengatasinya.

PROGRAM VAKSINASI YANG DILAKUKAN

Pada peternakan ayam kampung biasanya vaksinasi dilakukan apabila kasusnya menonjol di suatu daerah endemis. Dinas Peternakan akan melakukan program vaksinasi gratis bagi peternakan sektor 4. Akan tetapi bagi peternakan sektor 1, 2 dan 3 program vaksinasi lebih banyak tergantung dari peternaknya sendiri. Pada peternakan komersial biasanya mereka melakukan program vaksinasi secara teratur dan melalui program vaksinasi kombinasi antara vaksin hidup dan vaksin mati. Pada peternakan komersial biasanya peternak sudah terbiasa dengan mengontrol hasil vaksinasi dan apabila ingin melakukan program revaksinasi dilakukan pengujian titer ND sebelum dilakukan program vaksinasi.

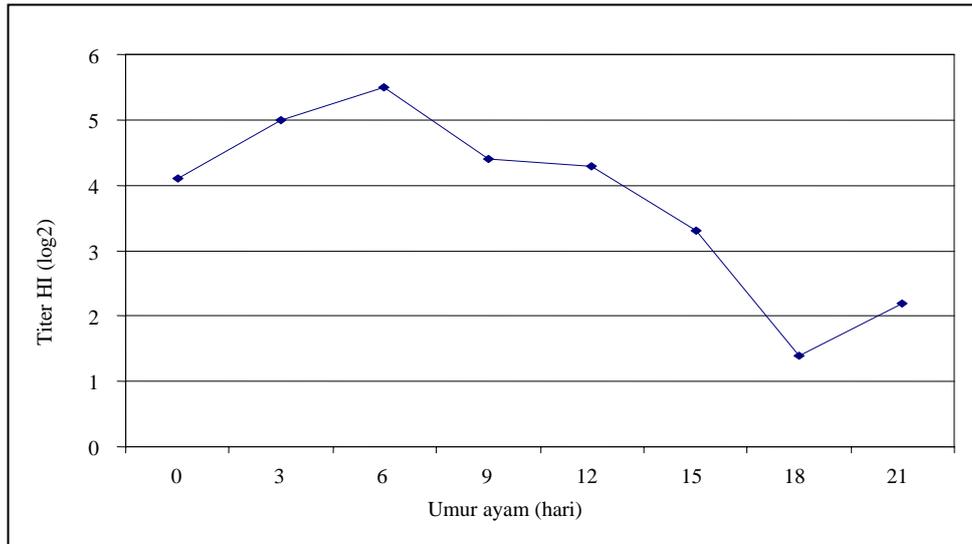
Kejadian di lapang menunjukkan bahwa program vaksinasi ND dilakukan lebih dari 13 kali untuk setiap ekor ayam *broiler breeder* karena adanya penurunan titer antibodi setiap kali sebelum pelaksanaan revaksinasi dilakukan (Gambar 3). Seperti diketahui program vaksinasi dilakukan oleh peternakan *layer* komersial ataupun peternakan *breeder* yang dimulai pada umur 4 hari, 4 minggu, 4 bulan dan seterusnya tiap enam bulan sekali, ataupun tergantung hasil uji titer HI. Apabila dilihat dari titer antibodi asal induk (*maternal antibody*) pada anak ayam, maka titer akan menurun sejak hari ke-3 dan menurun terus hingga hari ke-12. Banyak peternak berpatokan bahwa program vaksinasi dimulai sewaktu titer antibodi asal induk telah menurun (Gambar 4). Program revaksinasi biasanya dilakukan setiap ada gejala penurunan



Gambar 3. Sebaran titer antibodi terhadap ND (uji HI) dari ayam *broiler breeder* di tahun 2007

Catatan vaksinasi: Vaksin ND *killed*: umur 3, 12, 16, 20 minggu. Vaksin ND *live*: 4 hari, 3, 10, 18, 32, 40, 48, 56, 64 minggu

Sumber: SUDARISMAN (2009)

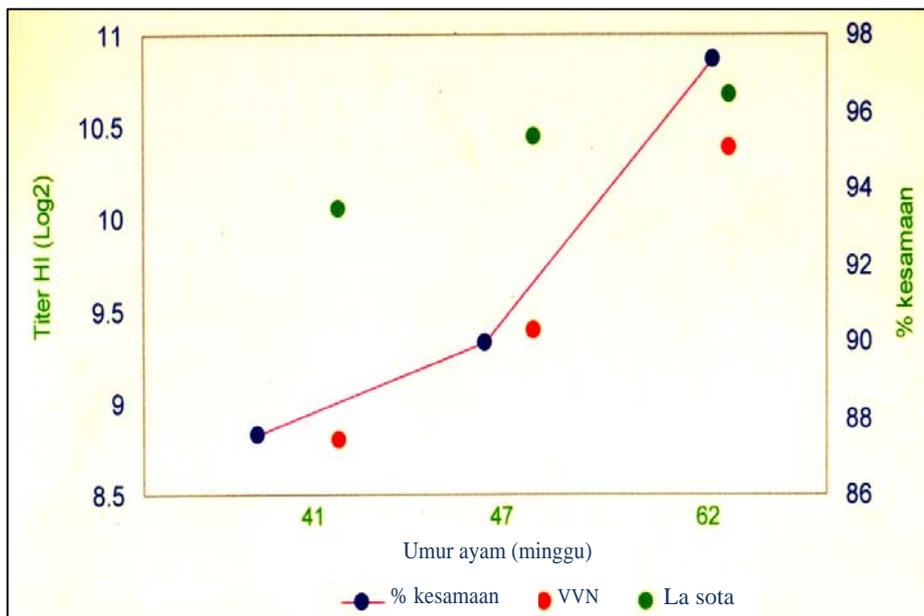


Gambar 4. Fluktuasi antibodi maternal ND pada ayam *broiler breeder* umur 0 – 21 hari

Sumber: SUDARISMAN (2009)

produksi telur yang diiringi dengan penurunan titer HI. Pada peternakan ayam *breeder*, biasanya program vaksinasi ND di Indonesia dilakukan dalam jumlah yang lebih banyak, seperti pada masa sebelum produksi, biasanya dilakukan enam kali program vaksinasi yang merupakan kombinasi antara vaksin hidup dan vaksin mati (Gambar 3).

Selama ini di Indonesia, titer HI jarang sekali dievaluasi dalam cara pengujian dan standarisasi pengujian yang dilakukan. Ternyata, apabila kita menggunakan antigen yang berbeda dalam pengujian, terlihat perbedaan yang nyata antara titer yang didapat pada awal pengujian (umur muda), akan tetapi setelah hewan semakin tua dan berumur, hasil pengujian tidak



Gambar 5. Sebaran titer antibodi ND (uji HI) dari ayam yang divaksinasi dengan vaksin La sota dan diuji dengan antigen La sota dan VVN

Sumber: SUDARISMAN (2009)

menunjukkan titer yang berbeda (Gambar 5). Kemungkinan adanya perbedaan dari sifat antigenitas atau adanya perbedaan biologik yang mungkin terjadi pada hewan yang relatif muda, akibat vaksin yang diberikan, akan sesuai dengan antibodi yang terbentuk. Akan tetapi apabila telah dewasa, ternak akan mendapatkan tantangan, tidak hanya dari vaksin yang diberikan, akan tetapi kemungkinan juga dari adanya serangan ND di lapang. Hal ini sering dilaporkan peternak, karena titer HI mengalami perubahan.

KESIMPULAN

ND merupakan penyakit viral pada unggas yang sangat menular dan memberikan dampak kematian yang tinggi. Ada tiga jenis virus ND yang didasarkan kepada aspek patologiknya, yaitu *lentogenic*, *mesogenic* dan *velogenic*. Pada tahun terakhir ini banyak sekali kejadian penyakit yang bersifat *velogenic-viscerotropic*, artinya virus sangat mematikan dan predileksinya lebih menonjol kepada saluran pencernaan dibandingkan dengan syaraf. Dampak dari program vaksinasi yang tidak tepat antara isolat lapang dengan vaksin yang digunakan, membuat penampilan klinis dari penyakit ini tidak segenas dibandingkan dengan penyakit yang dulu kita kenal. Perlu sekali pemantauan *phylogenetic tree* dari virus ND, disebabkan oleh tidak efektifnya program vaksinasi yang dijalankan. Disamping ada kecenderungan dari virus yang berubah patogenitasnya, walau *strain* dari virus tetap. Hal ini diketahui dari meningkatnya *score* ICPI. ICPI untuk virus ND yang virulen adalah antara 1,54 – 1,90, dibandingkan dengan kemungkinan nilai maksimumnya adalah 2,0. Perubahan genetik dan antigenik dari suatu isolat kemungkinan besar terjadi selama adaptasi dari satu spesies kepada yang lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Dr. Claudio Afonso dari South East Poultry Research Laboratory (SEPR), Athens, Georgia, USA atas bantuannya dalam kegiatan analisis *phylogenetic relationship* virus Newcastle Disease. Ucapan terima kasih disampaikan juga kepada Prof. Dr. Drh. Fedik Abdul Rantam, Ketua Departemen Mikrobiologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya. Kepada Drh. Adin Priadi juga diucapkan terima kasih atas bantuannya dalam analisis data hasil vaksinasi ayam di lapang.

DAFTAR PUSTAKA

- AFONSO, C. 2006. Phylogenetic characterization of endemic Newcastle disease viruses isolated from wild birds during 2000 – 2004 Delaware, Maryland dan New Jersey. AM. Ass. Avian Path. <http://www.ars.usda.gov/research/publications.htm?seq>. (1 April 2004).
- ALEXANDER, D.J. 2001. Newcastle disease. British Poult. Sci. 42: 5 – 22.
- ALLAN, W.H. and J.E. LANCASTER. 1978. Newcastle Disease vaccines. Their production and use. FAO Animal Production and Health Series. No. 10.
- CHO, S.H., H.J. KWON, T.E. KIM, J.H. KIM, H.S. YOO and S.J. KIM. 2008. Variation of Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase linear epitope. J. Clin. Microbiol. 46(4): 1541 – 1544.
- CZEGLEDI, A., J. HERCZEG, G. HADJIEV and L. DOUMANOVA. 2002. The occurrence of five major Newcastle Disease virus genotypes (II, IV, V, VI, and VII b) in Bulgaria between 1959 and 1996. Epidemiol. Infect. 129: 679 – 688.
- GLICKMAN, R.L., R.J. SYDDALL, R.M. IORIO, J.P. SHEEHAN and M.A. BRATT. 1988. Quantitative basic residue requirements in the cleavage activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle Disease virus. J. Virol. 62: 354 – 356.
- JEON, W.J., E.K. LEE, Y.J. LEE, O.M. JEONG, Y.J. KIM, J.H. KWON and K.S. CHOI. 2008. Protective efficacy of commercial inactivated Newcastle Disease virus vaccines in chickens against a recent Korean epizootic strain. J. Vet. Sci. 9(3): 295 – 300.
- KNAP, P.W. and C. BISHOP. 2008. Relationship between Genetic change and infectious disease in domestic livestock. An occasional Publication of the British society of Animal Science. Br. Sec. Anim. Sci. Midlothian, UK. pp. 65 – 80.
- LIEN, Y.Y., J.W. LEE, H.Y. SU, H.J. TSAI, M.C. TSAI, C.Y. HSIEH and S.S. TSAI. 2007. Phylogenetic characterization of Newcastle Disease viruses isolated in Taiwan during 2003 – 2006. Vet. Microbiol. 123: 194 – 202.
- LIU, M., Y. GUAN, M. PEIRIS, S. HE, R.J. WEBBY, D. PERVEIZ and R.G. WEBSTER. 2003. The quest of Influenza A virus for new host. Avian Dis. 47: 849 – 856.
- MAYO, M.A. 2002a. Virus Taxonomy-Houston. Arch. Virol. 147: 1071 – 1079.
- MAYO, M.A. 2002b. A summary of taxonomic changes recently approved by ACTV. Arch. Virol. 147: 1655 – 1663.
- McFERRAN, J.B. and R.M. MCCracken. 1988. Newcastle Disease. In: Newcastle Disease. ALEXANDER, D.J. (Ed.) Kluwer. Academic Publisher, Boston. pp. 161 – 183.

- NAGAI, Y., H.D. KLENK and R. ROTT. 1976. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significant for the virulence of Newcastle Disease virus. *Virology* 72: 494 – 508.
- OIE. 2000. Newcastle disease. *In: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 4th Edition*. World Organization for Animal Health, Paris, France. pp. 221 – 232.
- PEROZO, F., R. MERINO, C.L. AFONSO, P. VILLEGAS and N. CALDERON. 2008. Biological and phylogenetic characterization of virulent Newcastle Disease virus circulating in Mexico. *Avian Dis.* 52: 472 – 479.
- PETERS, B.P.H., O.S. LEEUW, G. KOCH and A.L.J. GIELKENS. 1997. Rescue of Newcastle Disease virus from cloned cDNA: Evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. Virol.* 73: 5001 – 5009.
- SAINSBURY, D. 1987. *Poultry Health and Management*. 2nd edition. BSP Professional Books, Oxford London Edinburgh.
- SEAL, B.S., D.J. KING and R.J. MEINERSMANN. 2000. Molecular evolution of the Newcastle Disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the paramyxoviridae. *Virus Res.* 66: 1 – 11.
- SUDARISMAN. 2009. Travel Report: Biomolecular techniques and project development at the USDA's Southeast Poultry Research Laboratory, Georgia, October, 18 – 31, 2008. Central Research Institute for Veterinary Science, Department Agriculture, Indonesia.
- WEI PING, C.W. TIAN, Y.Z. WEI, L.L. PING, L.G. WANG, Z.J. WEI, X.X. WEI, L.K. RAN and L. LIU. 2005. A study of the virulence associated genes of avian paramyxovirus type-1 isolates originated from different avian species. *Chinese J. Virol.* 21(1): 35 – 42.
- WESTBURY, H. 2001. Newcastle Disease Virus: An evolving pathogen? *Avian Pathol.* 30: 5 – 11.