

Susunan Nukleotida Gen Hemagglutinin-Neuraminidase dari Virus***Newcastle Disease Isolat Denpasar-03/AK/07***

(NUCLEOTIDE SEQUENCE OF HEMAGGLUTININ-NEURAMINIDASE GENE OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS ISOLATES DENPASAR-03/AK/07)

Lutfi Widiarta¹, Anak Agung Ayu Mirah Adi², I Made Kardena²

¹ Mahasiswa Pendidikan Profesi Dokter Hewan,

² Laboratorium Patologi Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana

Jl. P.B. Sudirman, Denpasar, Bali. Telp/Fax: (0361)223791

Email: lutfi.widiarta93@gmail.com

ABSTRAK

Virus *Newcastle Disease* (ND) merupakan salah satu agen penyakit unggas infeksius yang tersebar di Bali dan bersifat endemik. Virus ND merupakan virus dengan materi genetik RNA sehingga memiliki tingkat mutasi yang tinggi. Oleh karena itu evaluasi keragaman genetik virus di lapangan perlu diadakan secara berkala. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui susunan nukleotida gen penyandi protein HN dari Virus ND isolat lapangan asal kota Denpasar. Isolat Denpasar-03/AK/07 diisolasi dari kasus penyakit ND di Denpasar, Bali. Isolasi RNA dilakukan dengan metode Trizol. Fragmen gen penyandi protein HN diamplifikasi dengan RT-PCR. Hasil RT-PCR divisualisasikan pada gel agarosa 1% kemudian produk PCR ini disekuensing di PT. Genetika Science, Jakarta. Untuk melihat jarak genetik dan variasi asam amino, sekuen nukleotida yang didapat kemudian dijajarkan dengan beberapa isolate Virus ND terdahulu yang diakses dari Gen Bank. Analisis filogenetik dilakukan dengan menggunakan aplikasi MEGA version 6.0. Dari hasil analisa filogenetik didapatkan bahwa jarak genetik isolate ini dekat dengan isolat Bali-1/07 yakni 2,3 %. Namun terhadap isolat Banjarmasin /010/10, Gianyar /013/10, Kudus /018/10, dan Sragen /014/10 jarak genetiknya adalah 8,5%. Sementara itu dengan isolat Badung-02/AK/14 adalah 9 %. Jarak genetik antara isolat Denpasar-03/AK/07 dengan isolat vaksin LaSota/46 (genotipe II) adalah 84,8%. Dari analisis susunan asam amino didapatkan bahwa ada variasi antara isolat Denpasar-03/AK/07 dengan isolat terdahulu dari genotipe VII.

Kata kunci: Newcastle Disease, gen HN, nukleotida, asam amino.

ABSTRACT

Newcastle Disease (ND) Virus is one of the infectious poultry disease agents that is endemically spread in Bali. ND virus is virus with a RNA genetic material so if has a high level of mutation. There fore evolution of genetic viral diversity needs to be helde periodically. The aim of this study to determine the nucleotide sequence of HN protein encoding gene of ND virus field case from Denpasar. Isolates Denpasar-03/AK/07 was isolated from ND virus field case in Denpasar, Bali. RNA isolation was done by using Trizol method. HN protein encoding gene fragment was amplified by RT-PCR. The RT-PCR results were visualized with 1% agarose gel and sequenced at PT. Genetics Science, Jakarta. To determine a genetic distance and nucleotide sequence of amino acid variation , the nucleotide sequence were then aligned with some previous ND virus isolates accessed from Gene Bank. Analysis of phylogenetic tree was performed using MEGA version 6.0. The result showed that nucleotide sequence of this isolate was close to the Bali-1/07 isolate with genetic distance 2.3%. While with other isolate such as Banjarmasin /010/10, Gianyar /013/10, Kudus /018/10, and Sragen /014/10 genetic dis fance was 8.5%. Meanwhile, with Badung-02/AK/14 was 9%. The genetic distance between the Denpasar-03/AK/07 isolate with LaSota/46 vaccine isolates (genotype II) was

Keywords: Newcastle Disease, HN gene, nucleotides, amino acids.

PENDAHULUAN

Penyakit tetelo atau yang lebih dikenal dengan penyakit *Newcastle Disease* (ND) merupakan penyakit virus yang infeksius yang menyebabkan penurunan produksi dan kerugian ekonomi pada peternakan ayam (Alexander, 2000). Hingga saat ini penyakit tetelo telah ditemukan di berbagai belahan dunia termasuk di Indonesia, bahkan kasus penyakit tetelo yang disebabkan oleh virus patogen dari strain ganas (*viscerotropic velogenik*) telah dilaporkan pula terjadi di Indonesia (Adi *et al.*, 2011). Penyakit ND bersifat endemik di Bali dan ditemukan di berbagai daerah salah satunya adalah di Kota Denpasar. Virus ND atau yang disebut juga *Avian Paramyxovirus tipe 1* (APMV-1) diklasifikasikan dalam golongan genus *Avulavirus* dan ke dalam familia *Paramyxoviridae* yang memiliki ciri-ciri sebagai berikut; pleomorfik, beramplop, materi genetiknya RNA berantai tunggal (*single stranded RNA/ssRNA*) dengan polaritas negatif (*negative stranded*) (Lamb dan Parks, 2007; Dortmans *et al.*, 2011).

Virus ND memiliki enam macam protein yaitu *nukleokapsid* (NP), *fosfoprotein* (P), protein *matriks* (M), *glikoprotein fusi* (F), *hemagglutinin-neuraminidase* (HN), dan *RNA-dependent RNA polimerase* (L) dengan susunan 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' (Hines dan Miller, 2012). Protein yang berperan dalam menentukan patogenisitas lain yaitu gen protein F, namun ada beberapa gen lain seperti protein HN juga memegang peranan penting dalam menentukan keganasan virus ini (OIE, 2012). Protein HN berperan dalam proses absorpsi dan penetrasi virus ke dalam sel inang. Protein HN memiliki dua aktivitas penting yakni aktivitas hemagglutinin dan neuraminidase. Aktivitas dari hemagglutinin berperan dalam perlekatan partikel virus pada permukaan sel inang, sedangkan neuraminidase berperan dalam melepaskan partikel virus dari sel inang (Hines dan Miller, 2012). Mutasi pada bagian ekor dari protein HN terbukti dapat menurunkan virulensi virus ND (Khattar *et al.*, 2009).

Berbagai macam penelitian telah membuktikan bahwa variasi molekuler virus ND dapat terjadi secara temporal dan geografis, yang membentuk berbagai cabang dalam pohon filogenetik (Mohamed, *et al.*, 2009; Parthiban *et al.*, 2013). Tingginya keragaman genetik dari virus ND yang merupakan virus dengan materi genetik RNA dikarenakan tingkat mutasi yang tinggi. Penyebab mutasi yang paling sering terjadi pada virus yaitu kesalahan polimerisasi oleh enzim polimerase. Laju mutasi yang tinggi pada virus RNA ini disebabkan oleh RNA

polimerase virus tidak memiliki aktivitas *proofreading* (Martinez *et al.*, 2012). Tingginya mutasi pada virus ND menjadikan virus menarik untuk terus dikaji. Dinamika genotipe virus yang beredar di lapangan, khususnya pada gen HN isolat Denpasar-03/AK/07, harus dipantau secara periodik sebagai upaya mengendalikan kejadian penyakit akibat infeksi virus ND khususnya strain yang patogen. Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui susunan nukleotida, sehingga diketahui hubungan kekerabatan virus ini dengan virus ND yang diisolasi terdahulu dengan jarak genetik isolat vaksin saat ini.

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilaksanakan adalah penelitian observasional deskriptif dan pengambilan sampel dilakukan dalam satu waktu tertentu. Susunan sekuens nukleotida yang didapat dibandingkan dengan virus ND isolat dunia yang diakses dari *gene bank*. Analisis filogenetik untuk melihat jarak genetik dan variasi asam amino dilakukan dengan program MEGA 6

Lokasi dan Waktu Penelitian

Pengandaan materi genetik virus dengan metode PCR dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana. Sekuensing DNA dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler PT. Genetika Science, Jakarta Barat. Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret sampai Juni 2016.

Objek Penelitian

Objek dalam penelitian ini adalah isolat VND lapang dari Kota Denpasar Provinsi Bali yang diisolasi pada tahun 2007 yaitu isolat Denpasar-03/AK/07 koleksi dari Prof. drh. Anak Agung Ayu Mirah Adi, M. Si., Ph.D.

Prosedur Penelitian

Isolat yang didapatkan dari ayam yang telah dikonfirmasi positif VND, di propagasi pada telur ayam bertunas (TAB). RNA virus kemudian diisolasi dari cairan alantois dan dilanjutkan dengan RT-PCR. Ekstraksi dilakukan dengan metode trizol dengan tahapan sebagai berikut (Adi *et al.*, 2009; 2011) ; trizol ditambahkan ke cairan alantois dengan perbandingan 3:1, yakni 250 µl cairan alantois dicampur dengan 750 µl trizol, ke dalam campuran kemudian ditambahkan 200 µl kloroform, divorteks dan dibiarkan selama 15 menit, campuran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 15 menit supernatan diambil dan ditambahkan 500 µl isopropyl alkohol dan kembali didiamkan

selama 10 menit, campuran kembali disentrifugasi selama 10 menit pada 12000 rpm dan supernatant dibuang, pelet kemudian dicuci dengan 1000 µl alkohol 70% dan disentrifugasi dengan kecepatan 7500 rpm. Supernatant kemudian dibuang, RNA dikeringkan dan disuspensikan dalam *RNAse Free Water*.

Hasil dari ekstraksi RNA kemudian digunakan sebagai cetakan untuk proses *One Step RT-PCR*. Ke dalam setiap tabung mikro ditambahkan 5 µl R-Mix (yang terdiri dari buffer, MgCl dan dNTP), 1 µl *forward primer*, 1 µl *backward primer*, 2 µl aquabidest, dan 1 µl sampel RNA template. Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen HN adalah primer F_{15s} dengan susunan 5'-CAG AGA TCA CTC ACA TTC AT-3' sebagai *forward primer* dan primer F_{15r} dengan susunan 5'-GCC TAA GGA TGT TGA CAC CT-3' sebagai *reverse primer* (posisi ke 7019 – 7540 dari genom dari *Newcastle Disease*) (Adi, 2011). Tabung kemudian dimasukkan ke dalam mesin thermocycler dan diprogram sebagai berikut : *reverse RNA* menjadi cDNA pada suhu 50°C selama 1 jam. *Pre-denaturasi* pada suhu 95°C selama 7 menit dan *denaturasi* pada suhu 94°C selama 45 detik. Selanjutnya proses *anealing* selama 45 detik pada suhu 55°C dan tahap *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit. Keseluruhan proses PCR berlangsung selama 40 siklus. Masing-masing 5 µl produk PCR yang didapat kemudian di elektroforesis selama 50 menit dengan voltase 50 Volt. Dalam gel agarose 1% dengan *running buffer* TBE.

PCR *Product* yang didapatkan, kemudian dikirimkan ke Laboratorium Biologi Molekuler PT. Genetika Science, Jakarta Barat. Data yang diperoleh berupa susunan nukleotida kemudian dijajarkan dengan sekuens nukleotida gen penyandi protein HN representasi ND strain virulen dan avirulen yang diakses dari *gene Bank* dengan program Clustal IW (Adi *et al.*, 2011). Analisis filogenetik, jarak genetik dan sekuens asam amino dilakukan dengan program MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis 6*) (Tamura *et al.*, 2007).

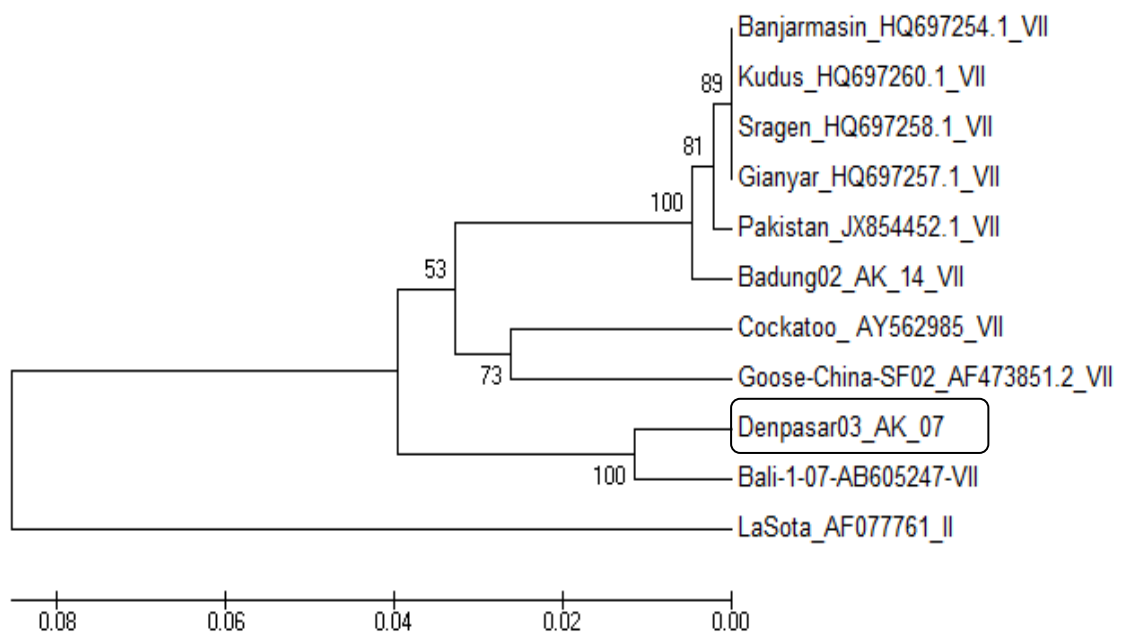
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil sekuensing dari PCR produk fragmen gen penyandi protein HN isolat Denpasar-03/AK/07 yang didapat adalah sepanjang 522 pb terdapat pada posisi nukleotida ke 7019 – 7540 dari genom keseluruhan dari VND, didapatkan yaitu sebagai berikut :

```
5'-ATCAATACTTGGCACTTGGCGTGCTTCGGACATCTGCAACAGGGAGGATATTCT
TTTCTACTCTGCGCTCCATCAATTTAGATGACACCCAAAATCGGAAGTCCTGCAGT
GTGAGTGCAACTCCCCTGGGTTGTGATATGCTGTGCTCGAAAGTCACGGAAACCG
AGGAAGAGGATTACAGGTCAGTTACCCCCACATCAATGGTGCACGGAAGGCTAG
```

GGTTTGACGGTCAATACCATGAGAAGGACTTAGACACCACAGTCTTATTTAAGGA
 TTGGGTAGCAAATTACCCAGGAGTGGGAGGTGGGTCCTTCATTGACGACCGTGTA
 TGGTCCCAGTTTACGGAGGGCTCAAACCCAATTCACCCAGTGACACTGCACAAG
 AAGGGAAGTATGTAATATAACAAGCGCTATAATAACACATGCCCCGATGAACAAG
 ATTACCAAATTCGAATGGCCAAGTCTTCGTATAAGCCTGGACGGTGGTAGAAAGC
 GCGTACAGCAAGCCATCTTATCTATTG-3

Hasil dari analisis filogenik didapatkan bahwa virus ini satu kluster dengan isolat Bali-1/07 (Gambar 1) yakni satu kluster dengan virus genotipe VII. Dengan kemiripan sekuen nukleotida sebagai berikut: dengan isolat Bali-1/07 97,7%, isolat Cocckato/90 93,5%, isolat Goose-China-SF02 92,9%, isolat Banjarmasin/010/10, isolat Gianyar/013/10, isolat isolat Kudus/018/10, Sragen/014/10 91,5%, dan isolat Badung-02/AK/14, isolat MM20-Pakistan/11 kemiripan sekuens 91%, dan yang tergolong kedalam genotipe II seperti isolat vaksin LaSota/46 kemiripan sekuens 84,8% (Gambar 1).



Gambar 1. Pohon filogenetik dari virus ND isolat Denpasar-03/AK/ berada pada satu kluster dengan isolat pendahulunya yang tergolong kedalam genotipe VII. Analisis filogenetik dilakukan dengan UPGMA (*Unweighed Pair Group Method with Arithmetic Mean*) pada program MEGA 6. dengan Bootsrap 500 kali. Angka pada titik percabangan menunjukkan nilai bootsrap dalam persen.

Dari hasil analisis dapat disimpulkan bahwa isolat Denpasar-03/AK/07 memiliki persentasi kemiripan paling tinggi dengan isolat Bali-1/07, yakni isolat yang diisolasi pada tahun yang sama namun dari wilayah berbeda (Adi *et al.*, 2010).

Susunan asam amino yang didapat dari fragmen penyandi protein HN dengan menerjemahkan sekuens nukleotida isolat Denpasar-03/AK/07 virus *Newcastle Disease* menggunakan program MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis 6*) (Tamura *et al.*, 2007). Asam amino ini disejajarkan dengan isolat pendahulunya dari genotipe VII dan isolat vaksin LaSota/46 dari genotipe II (Gambar 2).

Hasil dari 160 asam amino yang dapat dianalisis, isolat Denpasar-03/AK/07 menunjukkan persentase kemiripan susunan asam amino dengan isolat Badung-02/AK/14, isolat Bali-1/07, isolat Banjarmasin/010/10, isolat Cocckato/90, isolat Gianyar/013/10, isolat Goose-China-SF02, isolat Kudus/018/10, isolat MM20-Pakistan/11, isolat Sragen/014/10, dan isolat vaksin Lasota. Hasil analisis penjajaran asam amino menunjukkan bahwa tidak terdapat variasi pada 14 asam amino pertama dari virus ND isolat Denpasar-03/AK/07 dibanding dengan isolat lain yang tergolong genotipe VII seperti, isolat Badung-02/AK/14, isolat Bali-1/07, isolat Banjarmasin/010/10, isolat Cocckato/90, isolat Gianyar/013/10, isolat Goose-China-SF02, isolat Kudus/018/10, isolat MM20-Pakistan/11 dan isolat Sragen/014/10, serta isolat vaksin LaSota/46 tergolong pada genotipe II. Variasi mulai nampak pada asam amino ke-15 dimana pada isolat Denpasar-03/AK/07, isolat Bali-1/07, isolat Cocckato/90, isolat Goose-China-SF02 dan isolat vaksin LaSota/46 menyandi asam amino arginin, sedangkan pada isolat Badung-02/AK/14, isolat Banjarmasin/010/10, isolat Gianyar/013/10, isolat Kudus/018/10 dan isolat MM20-Pakistan/11 dan isolat Sragen/014/10 menyandi asam amino lisin.

#Denpasar03_AK_07	QYLALGVLRT	SATGRIFFFST	LRSINLDDTQ	NRKSCSVSAT	PLGCDMLCSK	VTETEEEDYR
#Badung02_AK_14_VIIKV.....I.....K
#Bali-1-07-AB605247-VII
#Banjarmasin_HQ697254.1_VIIKV.....I.....K
#Cockatoo__AY562985_VIIV.....K
#Gianyar_HQ697257.1_VIIKV.....I.....K
#Goose-China-SF02_AF473851.2_VIIV.....G.....K
#Kudus_HQ697260.1_VIIKV.....I.....K
#LaSota_AF077761_IIV.....	A.....N
#Pakistan_JX854452.1_VIIKV.....I.....K
#Sragen_HQ697258.1_VIIKV.....I.....K
#Denpasar03_AK_07	SVTPTSMVHG	RLGFDGQYHE	KLDLTTVLFK	DWVANYPGVG	GGSFIDDRVW	FPVYGGLKPN
#Badung02_AK_14_VIIA.....V.E.....
#Bali-1-07-AB605247-VII
#Banjarmasin_HQ697254.1_VIIA.....V.E.....
#Cockatoo__AY562985_VIIR.....	..G.....	V.....
#Gianyar_HQ697257.1_VIIA.....V.E.....
#Goose-China-SF02_AF473851.2_VII	..A.....A.....
#Kudus_HQ697260.1_VIIA.....V.E.....
#LaSota_AF077761_II	..AV..R.....V.T..G.....S.....	S.....
#Pakistan_JX854452.1_VIIE.....A.....T.V.E.....
#Sragen_HQ697258.1_VIIA.....V.E.....
#Denpasar03_AK_07	SPSDTAQEGK	YVIYKRYNNT	CPDEQDYQIR	MAKSSYPKGR		
#Badung02_AK_14_VIID.....		
#Bali-1-07-AB605247-VIIE.....		
#Banjarmasin_HQ697254.1_VIID.....		
#Cockatoo__AY562985_VII		
#Gianyar_HQ697257.1_VIID.....		
#Goose-China-SF02_AF473851.2_VIIH.....F.....		
#Kudus_HQ697260.1_VIID.....		
#LaSota_AF077761_IIV.....D.....		
#Pakistan_JX854452.1_VIID.....		
#Sragen_HQ697258.1_VIID.....		

Gambar 2. Penjajaran asam amino fragmen penyandi protein HN dari isolat Denpasar-03/AK/07, isolat lain yang tergolong dalam genotip VII, dan satu isolat vaksin LaSota/64.

Hasil dari susunan nukleotida dan asam amino yang didapat dengan analisis jarak genetik fragmen penyandi protein HN dari isolat Denpasar-03/AK/07 dengan isolat Badung-02/AK/14, isolat Bali-1/07, isolat Banjarmasin/010/10, isolat Cocckato/90, isolat Gianyar/013/10, isolat Goose-China-SF02, isolat Kudus/018/10, isolat MM20-Pakistan/11, isolat Sragen/014/10, dan isolat vaksin LaSota/46 (Gambar 3).

```

[ 1] #Denpasar03_AK_07
[ 2] #Badung02_AK_14_VII
[ 3] #Bali-1-07-AB605247-VII
[ 4] #Banjarmasin_HQ697254.1_VII
[ 5] #Cockatoo__AY562985_VII
[ 6] #Gianyar_HQ697257.1_VII
[ 7] #Goose-China-SF02_AF473851.2_VII
[ 8] #Kudus_HQ697260.1_VII
[ 9] #LaSota_AF077761_II
[10] #Pakistan_JX854452.1_VII
[11] #Sragen_HQ697258.1_VII

```

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
[1]											
[2]	0.090										
[3]	0.023	0.085									
[4]	0.085	0.008	0.077								
[5]	0.065	0.075	0.069	0.067							
[6]	0.085	0.008	0.077	0.000	0.067						
[7]	0.071	0.069	0.067	0.060	0.052	0.060					
[8]	0.085	0.008	0.077	0.000	0.067	0.000	0.060				
[9]	0.152	0.169	0.175	0.173	0.165	0.173	0.179	0.173			
[10]	0.090	0.012	0.081	0.004	0.071	0.004	0.065	0.004	0.177		
[11]	0.085	0.008	0.077	0.000	0.067	0.000	0.060	0.000	0.173	0.004	

Gambar 3. Analisis jarak genetik fragmen penyandi protein HN dari isolat Denpasar-03/AK/07, dengan isolat lain yang tergolong dalam genotip VII, dan satu isolat vaksin LaSota/6 genotip II.

Jarak genetik fragmen penyandi protein HN dari isolat Denpasar-03/AK/07 dengan isolat vaksin LaSota/46 dengan perbedaan 15,2%. Sedangkan jarak genetik dengan sesama isolat digenotip VII seperti isolat Bali-1/07 2,3 %, isolat Cockatoo/90 6,5%, isolat Goose-China-SF02 7,1%, isolat Badung-02/AK/14 dan isolat MM20-Pakistan/11 adalah 9%. Yang diisolasi belakangan seperti isolat Banjarmasin/010/10, Gianyar/013/10, Kudus/018/10, dan Sragen/014/10 adalah 8,5 %,.

SIMPULAN

Berdasarkan analisis filogenetik fragmen gen HN isolat Denpasar-03/AK/07 tergolong ke dalam genotipe VII. Jarak genetik dengan Isolat Banjarmasin/010/10, Gianyar/013/10, Kudus/018/10, dan Sragen/014/10 adalah 8,5 %. Sementara itu dengan isolat Badung-02/AK/14 adalah 9 %. Dari perbandingan asam amino dengan isolat tersebut tidak ditemukan variasi asam amino pada 14 asam amino pertama.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi karakter dari susunan protein seperti protein NP, protein P, protein M, protein F, dan protein L di isolat Denpasar-03/AK/07.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih terutama kepada Balai Besar Veteriner Denpasar dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana tempat penelitian ini dilaksanakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adi AAAM, Astawa NM, Putra KSA, Hayashi Y, Matsumoto Y. 2009. Isolation And Characterization Of A Pathogenic Newcastle Disease Virus From A Natural Case In Indonesia. *J. Vet. Med. Sci.* 72(3): 313-319.
- Adi AAAM, Astawa NM, Putra KSA, Hayashi Y, Matsumoto Y. 2010. Molecular Characterization of the Complete Genome of a Viscerotropic Velogenic Newcastle Disease Virus NDV/Bali-1/07. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AB605247>. Accessed Juny 5, 2016.
- Adi AAAM, Kardena IM, Astawa NM, Putra KSA, Hayashi Y, Matsumoto Y. 2011. Kloning, kuensing dan Analisis Filogenetik Gen Nukleokapsid Protein Virus Tetelo Isolat Bali-1/07. *Jurnal Veteriner.* 12(3): 173-179.
- Alexander DJ. 2000. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 19(2): 443-462.
- Dortmans JC, Koch G, Rottier PJ, Peeters BP. 2011. Virulence of Newcastle Disease Virus: What Is Known So Far?. *Vet Res.* 42: 1-11.
- Hines NL, Miller CL. 2012. Avian Paramyxovirus Serotype-1: A Review of Disease Distribution, Clinical Symptoms, and Laboratory Diagnostics. *Vet Med Int.*
- Khattar SK, Yan Y, Panda A, Collins PL, Samal SK. 2009. A Y526Q Mutation in the Newcastle Disease Virus HN Protein Reduces Its Functional Activities and Attenuates Virus Replication and Pathogenicity. *J Virol.* 83(15): 7779–7782.
- Lamb R, Parks G. 2007. *Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication.* 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, P.A.
- Martinez MA, Martrus G, Capel E, Parera M, Franco S, Nevot M. 2012. Quasispecies Dynamics of RNA Viruses. In Witzany, G. *Viruses: Essential Agents of Life.* Springer. Pp. 21–42.
- Mohamed MHA, Kumar A, Paldurai A, Megahed MM, Ghanem IA, LebDAH MA, Samal SK. 2009. Complete Genome Sequence of a Virulent Newcastle Disease Virus Isolated from an Outbreak in Chickens in Egypt. *Virus genes* DOI 10.1007/s11262-009-0385-7.
- Office International des Epizooties (OIE). 2012. *Terrestrial Manual.* Chapter 2.3.14 Newcastle Disease. Pp 1-19.
- Parthiban M, Kaliyaperumal M, Xiao S, Nayak B, Paldurai A, Kim S, Ladman BS, Preskenis LA, Gelb J, Collins PL, Samal SK. 2013. Complete Genome Sequence of an Avian Paramyxovirus Type 4 from North America Reveals a Shorter Genome and New Genotype. *Genome Announc* 1(1): e00075-12.doi:10.1128/genomeA.00075-12.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.