

Studi Histopatologi Limpa dan Otak Ayam Terinfeksi Penyakit Tetelo

(*STUDY HISTOPATHOLOGY SPLEEN AND BRAIN INFECTED BY NEW CASTLE DISEASE*)

Lidia Nofantri¹, I Ketut Berata², Anak Agung Ayu Mirah Adi²

¹Mahasiswa Profesi Dokter Hewan,

²Laboratorium Patologi Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana

Jl. P.B. Sudirman Denpasar Bali, Telp: 0361-223791

e-mail: lidianofantri@gmail.com

ABSTRAK

Lesi histopatologi organ limpa dan otak ayam terinfeksi virus penyakit Tetelo dipengaruhi oleh strain virus yang menginfeksi, jenis dan umur ayam serta status vaksinasi. Hasil gambaran lesi histopatologi sangat bermanfaat dalam mengarahkan diagnosis penyakit hewan yang bersangkutan. Penelitian dilakukan untuk mempelajari variasi lesi histopatologi limpa dan otak ayam terinfeksi virus penyakit Tetelo. Penelitian menggunakan 20 sampel limpa dan 20 data otak ayam yang terinfeksi penyakit Tetelo yang telah dikonfirmasi di Laboratorium Virologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana. Sampel limpa dan otak ayam dibuat preparat histopatologi dengan pewarnaan hematoksin eosin (HE). Variabel yang diperiksa pada limpa meliputi deplesi status sel-sel limfoid, nekrosis dan kongesti. Sedangkan variabel yang diperiksa pada otak meliputi adanya peradangan, degenerasi dan nekrosis. Hasil pemeriksaan lesi histopatologi pada limpa dan otak ayam terinfeksi virus penyakit Tetelo ditemukan lesi yang bervariasi. Dari 20 sampel, lesi yang paling banyak ditemukan pada limpa adalah deplesi sel-sel limfoid, selanjutnya proliferasi sel-sel limfoid, nekrosis, kongesti dan peningkatan jumlah sel makrofag. Pada otak ayam terinfeksi penyakit Tetelo ditemukan lesi histopatologi yang dominan berupa vasculitis dan gliosis. Yang diikuti oleh *perivascular cuffing*, edema *perivascular* dan nekrosis sel purkinje. Dapat disimpulkan bahwa terdapat kemungkinan hubungan antara deplesi sel-sel limfoid di limpa dengan vasculitis dan gliosis di otak.

Kata kunci : ayam, histopatologi, limpa, otak, tetelo.

ABSTRACT

Histopathological lesions of chicken spleen and brain who infected by Newcastle disease was influenced by virus strain, the type and age of chicken and vaccine status. The histopathological result will be very beneficial to diagnose the disease of the animal. This research was done to study histopathological lesion variant of chicken spleen and brain that infected by Newcastle disease. This research use 20 spleen sample and 20 brain sample from chicken that infected by Newcastle disease who already confirmed by Laboratorium Virology of Udayana University. Spleen and brain of chicken sample used to make histopathological picture and stained with hematoxylin eosin (HE). The variable that used to determine infection in histopathological picture of brain is inflammation, degeneration, and necrosis. However, the variable that used to determine infection in histopathological picture of spleen is status depletion of lymphoid cell, necrosis and congesty. The result of histopathological picture spleen and brain of infected chicken found variation lesion. From 20 sample, the lesion most found in spleen is depletion of lymphoid cell, followed by proliferation of lymphoid cell, necrosis, congesty and increase of macrophage cell. On the other hand in the brain of infected chicken found the most dominant histopathological lesion is vasculitis and gliosis. It followed by *perivascular cuffing*, oedema, *perivascular* and necrosis purkinje cell. Can be conclude that there is a possible connection between depletion of lymphoid cell in spleen with vasculitis and gliosis in the brain.

Keywords: chickens, histopathology, spleen, brain, newcastle disease.

PENDAHULUAN

Peternakan ayam banyak membantu penyediaan protein hewani. Dalam perkembangannya, peternak terkendala oleh berbagai penyakit yang dapat menyerang ayam salah satunya adalah *Newcastle Disease* (ND) atau Tetelo. Penularannya melalui kontak langsung antara hewan sehat dan terinfeksi. Material yang berpotensi menularkan virus penyakit Tetelo berasal dari eksudat hidung, mulut, dan mata dari ayam yang terinfeksi ke ayam sehat sekitarnya. Tingkat keparahan penyakit ini dipengaruhi oleh strain virus, spesies inang, umur inang, ada tidaknya infeksi sekunder, stres dan kekebalan inang. Gejala umum yang ditimbulkan berupa anoreksia, penurunan produksi telur dan adanya pembengkakan (edema) disekitar area mata (OIE, 2012).

Beberapa laporan menyebutkan bahwa strain virus penyakit Tetelo yang ada di Indonesia saat ini telah mengalami perubahan dari segi genetik. Diagnosis yang ditetapkan selama ini oleh patologis di lapangan dalam menentukan arah penyakit masih mengacu pada perubahan patognomonis penyakit Tetelo sesuai lesi-lesi yang ditemukan. Lesi patognomonis pada penyakit Tetelo ditandai dengan ptechia pada proventrikulus, ventrikulus, usus, seka tonsil, trakhea dan paru-paru (Kencana dan Kardena, 2011). Lesi pada usus terutama terjadi pada bentuk tipe vicerotropik (Jordan, 1990). Velogenik viscerotropik penyakit Tetelo juga menimbulkan hiperemi dan bengkak pada konjungtiva, nekrosis tonsil, atrofi bursa Fabricius dan timus (Nakamura *et al.*, 2010). Lesi pada otak selalu teramati pada ayam terinfeksi dengan tipe velogenik neurotropik walaupun kadang juga ditemukan pada tipe viscerotropik dan mesogenik (Bhaiyat *et al.*, 1994).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran lesi histopatologi organ limpa dan otak ayam yang terinfeksi penyakit Tetelo yang bervariasi akibat perbedaan strain virus, jenis ayam, umur ayam dan status vaksinasi. Hasil gambaran lesi histopatologi ini akan sangat bermanfaat dalam mengarahkan diagnosis penyakit hewan yang bersangkutan.

METODE PENELITIAN

Sampel Penelitian

Penelitian bersifat observasi dari kasus penyakit Tetelo berdasarkan variasi lesi histopatologi limpa dan otak ayam terinfeksi virus penyakit Tetelo. Penelitian menggunakan 20 sampel limpa dan otak ayam yang didiagnosa di Laboratorium Patologi dan dikonfirmasi terinfeksi virus penyakit Tetelo di Laboratorium Virologi baik dengan uji HA-HI maupun uji

PCR Sampel limpa dan otak ayam yang digunakan merupakan kasus yang didiagnosa dari tahun 2012–2014. Data yang dicatat meliputi umur, jenis kelamin, jenis ayam, dan status vaksinasi

Pembuatan Preparat Histopatologi

Pengamatan histopatologi pada pemeriksaan preparat histopatologi yang dibuat dengan pewarnaan Hemotoaylin Eosin (HE). Adapun tahapan pembuatan preparat adalah sebagai berikut : organ – organ yang akan diperiksa dipotong kecil – kecil dengan ukuran $1 \times 1 \times 1$ cm, kemudian potongan organ – organ tersebut direndam dalam larutan *Neutral Buffer Formalin* (NBF) 10 %. Potongan organ – organ kecil tersebut selanjutnya diperkecil lagi dengan irisan tipis untuk disimpan dalam *tissue cassette* dan dilakukan fiksasi dalam larutan NBF selama 24 jam. Setelah dilakukannya fiksasi, sampel organ tersebut berturut – turut ke dalam alcohol 70 %, 80%, 90%, 96%, alcohol absolute selama beberapa jam. Tujuan proses ini adalah menarik cairan yang ada dalam sitoplasma.

Proses selanjutnya adalah *clearing* atau penjernihan dengan merendam potongan organ dalam benzana, lalu infiltrasi dengan paraffin cair. Sampel organ dilakukan *embedding set* dan *blocking*, kemudian digunakan paraffin cair untuk mempermudah pemotongan jaringan dan disimpan dalam lemari es selama 24 jam. Blok yang sudah dingin dilakukan *sectioning* atau pemotongan dengan alat *microtome* ± 5 mikron. Tahap terakhir adalah tahap pewarnaan dengan metode Harris Hematoxylin – Eosin dan *mounting* media (Kiernan, 1990).

Variabel yang diperiksa

Pemeriksaan mikroskopik pada limpa meliputi adanya proliferasi sel-sel limfoid atau deplesi sel-sel limfoid, kongesti, nekrosis, dan peningkatan sel makrofag. Sedangkan pada otak pemeriksaan mikroskopik yang diamati meliputi adanya *Perivascular cuffing*, vaskulitis, edema perivaskuler, gliosis, dan nekrosis sel Purkinje. Perubahan–perubahan histopatologi yang diamati kemudian ditabulasi dan dipersentasekan, selanjutnya dianalisis secara deskriptif kuantitatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan histopatologi 20 limpa dan 20 otak ayam yang terinfeksi penyakit Tetelo diperoleh hasil pada limpa ditemukan lesi proliferasi sel-sel limfoid sebanyak 20%, deplesi sel-sel limfoid sebanyak 75%, kongesti sebanyak 10%, nekrosis sebanyak 15%, dan peningkatan sel makrofag sebanyak 10%. Pada otak ditemukan lesi histopatologi berupa perivascular cuffing sebanyak 30%, vaskulitis sebanyak 50%, edema perivascular sebanyak

25%, gliosis sebanyak 50%, dan nekrosis sel purkinje sebanyak 10%. Lesi di limpa didominasi dengan lesi deplesi sel-sel limfoid (75%), sedangkan pada otak ditemukan lesi dominan berupa vaskulitis (50%) dan gliosis (50%)

Tabel 1. Data hasil pemeriksaan histopatologi limpa dan otak ayam yang terinfeksi penyakit Tetelo.

No	Perubahan Histopatologi									
	Limpa					Otak				
	Proliferasi sel-sel limfoid	Depleksi sel-sel limfoid	Kongesti	Nekrosis	Peningkatan Sel Makrofag	Perivascular Cuffing	Vaskulitis	Edema Perivas Culer	Gliosis	Nekrosis Sel Purkinje
1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
2	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
3	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
4	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
5	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
6	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
7	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
8	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
9	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
10	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
11	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
12	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
13	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
14	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
15	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
16	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
17	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
18	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
19	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
20	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Jumlah	4	15	2	3	2	6	10	5	10	2
Persentase	20%	75%	10%	15%	10%	30%	50%	25%	50%	10%

Tabel 2. Data hasil pemeriksaan histopatologi otak ayam terinfeksi penyakit Tetelo menurut ayam yang tidak divaksinasi dengan rentang umur 1 minggu sampai 2 tahun

No	No Kasus	Jenis unggas	Jenis kelamin	Otak				
				Perivascular Cuffing	Vaskulitis	Edema Perivaskuler	Gliosis	Nekrosis Sel Purkinje
1	538/N/13	Ayam kampung	Jantan	+	-	-	-	-
2	510/N/13	Ayam broiler	Jantan	+	-	+	-	-
3	446/N/12	Ayam kampung	Betina	-	+	-	+	-
4	509/N/13	Ayam kampung	Jantan	+	-	-	-	-
5	578/N/14	Ayam broiler	Betina	-	-	-	+	-
6	448/N/12	Ayam kampung	Jantan	-	+	-	-	+
7	586/N/14	Ayam kampung	Betina	+	+	-	-	-
8	565/N/13	Ayam kate	Betina	-	-	-	+	-
9	527/N/13	Ayam kampung	Jantan	-	+	-	+	-
10	607/N/14	Ayam kampung	Jantan	-	-	-	-	+
11	582/N/14	Ayam kampung	Betina	+	-	-	-	-
12	388/N/12	Ayam kampung	Betina	-	+	+	+	-

Tabel 3. Data hasil pemeriksaan histopatologi otak ayam terinfeksi penyakit Tetelo menurut ayam yang sudah divaksinasi dengan rentang umur 1 minggu sampai 2 tahun.

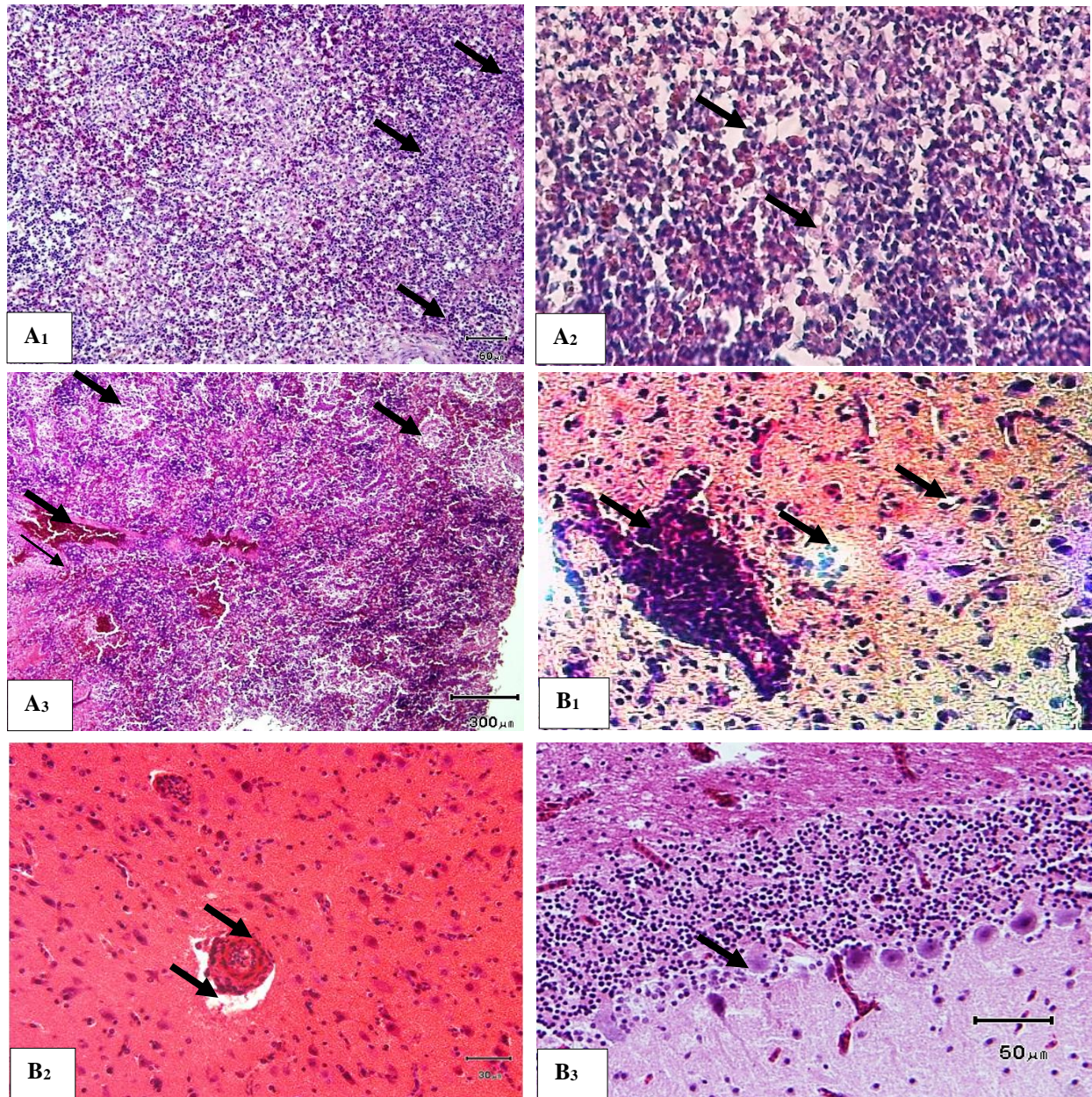
No	No Kasus	Jenis unggas	Jenis kelamin	Otak				
				Perivascular Cuffing	Vaskulitis	Edema Perivaskuler	Gliosis	Nekrosis Sel Purkinje
1	449/N/12	Ayam Broiler	Betina	-	+	-	+	-
2	618/N/14	Ayam Broiler	Betina	+	-	+	-	-
3	400/N/12	Ayam Broiler	Betina	-	-	-	+	-
4	524/N/14	Ayam Broiler	Betina	-	+	-	-	-
5	547/N/14	Ayam Kate	Betina	-	-	-	+	-
6	648/N/14	Ayam Kate	Betina	-	+	+	+	-
7	549/N/14	Ayam Kampung	Betina	-	+	-	-	-
8	395/N/12	Ayam Petelur	Betina	-	+	+	-	-

Tabel 4. Data hasil pemeriksaan histopatologi limpa ayam terinfeksi penyakit Tetelo menurut ayam yang tidak divaksinasi dengan rentang umur 1 minggu sampai 2 tahun.

No	No Kasus	Jenis unggas	Jenis kelamin	Limpa				
				Proliferasi sel-sel limfoid	Depleksi sel-sel limfoid	Kongesti	Nekrosis	Peningkatan Sel Makrofag
1	538/N/13	Ayam Kampung	Jantan	-	+	-	-	-
2	510/N/13	Ayam Broiler	Jantan	-	+	-	-	-
3	446/N/12	Ayam Kampung	Betina	-	-	-	-	+
4	509/N/13	Ayam Kampung	Jantan	-	+	-	-	-
5	578/N/14	Ayam Broiler	Betina	-	+	-	+	-
6	448/N/12	Ayam Kampung	Jantan	-	+	-	-	-
7	586/N/14	Ayam Kampung	Betina	+	+	-	-	-
8	565/N/13	Ayam Kate	Betina	+	-	+	-	-
9	527/N/13	Ayam Kampung	Jantan	+	-	-	-	-
10	607/N/14	Ayam Kampung	Jantan	-	+	-	-	-
11	582/N/14	Ayam Kampung	Betina	-	+	-	-	-
12	388/N/12	Ayam Kampung	Betina	-	+	+	+	-

Tabel 5. Data hasil pemeriksaan histopatologi limpa ayam terinfeksi penyakit Tetelo menurut ayam yang sudah divaksinasi dengan rentang umur 1 minggu sampai 2 tahun.

No	No Kasus	Jenis unggas	Jenis kelamin	Limpa				
				Proliferasi sel-sel limfoid	Depleksi sel-sel limfoid	Kongesti	Nekrosis	Peningkatan Sel Makrofag
1	449/N/12	Ayam Broiler	Betina	-	+	-	-	+
2	618/N/14	Ayam Broiler	Betina	-	+	-	-	-
3	400/N/12	Ayam Broiler	Betina	-	+	-	-	-
4	524/N/14	Ayam Broiler	Betina	-	+	-	-	-
5	547/N/14	Ayam Kate	Betina	-	+	-	-	-
6	648/N/14	Ayam Kate	Betina	-	+	-	-	-
7	549/N/14	Ayam Kampung	Betina	-	+	-	-	-
8	395/N/12	Ayam Petelur	Betina	+	-	-	-	-



Gambar 1. Lesi histopatologi limpa dan otak ayam terinfeksi penyakit Tetelo. Pada limpa ditemukan adanya proliferasi sel-sel limfoid (A₁), adanya nekrosis disertai dengan peningkatan sel makrofag (A₂) dan terjadinya deplesi pada pulpa putih serta ditemukan terjadinya kongesti (A₃). Pada otak terbentuknya perivaskular *cuffing* serta terjadinya gliosis (B₁), adanya vasculitis disertai dengan edema perivaskular (B₂), dan terjadinya nekrosis sel-sel purkinje pada *cerebellum* (B₃). (A₁= HE, 100x; A₂= HE, 400x; A₃= HE, 100x; B₁= HE, 400x; B₂= HE, 100x; B₃= HE, 100x).

Limpa merupakan organ pertahanan sekunder yang berfungsi untuk memproduksi sel-sel limfosit dan berperan penting dalam menahan serangga agen yang berhasil mencapai sirkulasi darah guna menahan invasi organisme atau toksin sebelum menyebar lebih luas. Apabila fungsi limpa bertambah maka akan terjadi perubahan pada konsistensi dan ukuran limpa yaitu limpa akan membengkak. Pembengkakan yang dimaksud disini adalah respon karena adanya infeksi virus penyakit Tetelo yang akan merangsang sel-sel limfoid untuk

membentuk antibodi. Keberadaan virus penyakit Tetelo pada jaringan limfoid menyebabkan limfolisis pada *germinal centre* dan mengakibatkan debris inti sel sehingga pada limpa terlihat nekrosis dan deplesi limfoid (Eriwati, 2015). Menurut Mohammadamin dan Qubih (2011) deplesi limfosit di limfoid limpa, merupakan lesi paling menonjol yaitu ditandai dengan lebih sedikit limfoid dari biasanya. Perubahan histopatologi ini menunjukkan bahwa sistem pertahanan tubuh ayam terinfeksi penyakit Tetelo. Perubahan histopatologi yang menonjol dalam organ limfoid, ditandai dengan penipisan, degenerasi dan nekrosis jaringan limfoid. Deplesi limfosit pada jaringan limfoid biasanya adalah suatu respon inflamasi akut karena migrasi heterofil dan limfosit dari organ-organ limfoid ke tempat inflamasi akibat rangsangan mediator inflamasi (Jain, 1993). Nakamura *et al.* (2008) juga melaporkan bahwa secara histologis ayam yang terinfeksi virus penyakit Tetelo menunjukkan lesi nekrosis dan deplesi pada jaringan limfoid.

Lesi histopatologi pada otak ayam yang terinfeksi virus penyakit Tetelo juga bervariasi dari 20 sampel yang diperiksa lesi vaskulitis sebanyak 50% dan gliosis sebanyak 50%. Selanjutnya diikuti oleh *perivascular cuffing* sebanyak 30%, edema perivascular sebanyak 25% dan nekrosis sel Purkinje sebanyak 10% (Tabel 1). Keberadaan virus penyakit Tetelo pada otak dapat menyebabkan kerusakan vaskuler dan neuron yang menyebabkan terjadinya proses inflamasi. Berupa hiperemi, *perivascular cuffing*, edema, gliosis dan sklerosis. Respon inflamasi ini diawali dengan penyebaran makrofag. *Perivascular cuffing* selanjutnya terjadi penyebaran lokal pada astrosid dan sel mikroglial. Mediator inflamasi dilepaskan dari limfosit, sel-sel mikroglial dan *trafficking* makrofag sehingga menginisiasi terjadinya lesi pada organ (Zachary, 2007). Usman *et al.* (2008) melaporkan bahwa di otak ayam penderita penyakit Tetelo ditemukan limfositik *perivascular cuffing* dan hiperemi pembuluh darah.

Otak adalah organ pertama yang terkena dampak, dengan perubahan yang memperhatikan 3 hari setelah infeksi virus penyakit Tetelo. Isolasi virus dari berbagai organ lebih umum dilakukan pada 5-10 hari setelah infeksi, walaupun virus tetap bertahan di beberapa organ sampai 21 hari setelah infeksi. Menurut Alexander (1991) melaporkan bahwa tipe sedang (mesogenik) pada virus penyakit Tetelo menyerang sistem saraf (otak) ayam muda, dan tipe ini jarang terjadi pada ayam dewasa. Nakamura *et al.* (2008) melaporkan bahwa secara mikroskopik juga ditemukan *perivascular cuffing*, degenerasi neuronal dan nekrosis, dan gliosis terjadi dalam otak ayam terinfeksi penyakit Tetelo.

Adanya hubungan antara vaskulitis dan gliosis di otak terhadap deplesi sel-sel limfoid dikarenakan limfoid yang diproduksi dalam limpa sudah menyebar dan mengakibatkan vaskulitis dan gliosis pada otak ayam. Wakamatsu *et al.* (2006) melaporkan bahwa pada kalkun, deplesi sel limfoid dan nekrosis diamati disemua organ limfoid tetapi pada ayam tidak terlalu parah. Deplesi sel limfoid dapat dijumpai di limpa, sedangkan pada otak dapat dijumpai gliosis ringan dan *perivascular cuffing*. Adi *et al.* (2010) juga melaporkan bahwa ayam terserang virus penyakit Tetelo ketika wabah di Bali menunjukkan atrofi pada organ limfoid seperti bursa Fabricious, timus dan limpa. Pada pemeriksaan histopatologi menunjukkan meningoensefalomyelitis nonsuppuratif ditandai dengan nekrosis neuron, gliosis multifokal sampai difus dan *perivascular cuffing* dari sel-sel mononuklear, nekrosis hemoragik pada trakea dan usus serta deplesi dan nekrosis pada jaringan limfoid termasuk bursa Fabricious. Infeksi virus penyakit Tetelo tidak hanya merusak sel neuron tetapi juga merusak vaskuler yang ditandai dengan hipertrofi endotel, vaskulitis terutama pada lapisan serebelum (Nakamura *et al.*, 2008; Kommers *et al.*, 2002). Salah satu usaha dari sistem saraf untuk menjaga keutuhan neuron dari infeksi virus penyakit Tetelo adalah terbentuknya gliosis di otak.

SIMPULAN

Lesi histopatologi pada limpa ayam terinfeksi penyakit Tetelo meliputi deplesi sel-sel limfoid, proliferasi sel-sel limfoid, nekrosis, kongesti dan peningkatan sel makrofag. Sedangkan lesi histopatologi pada otak ayam terinfeksi penyakit Tetelo meliputi vaskulitis, gliosis, *perivascular cuffing*, edema *perivascular* dan nekrosis sel Purkinje. Secara deskriptif kemungkinan terdapat hubungan antara deplesi sel-sel limfoid dengan vaskulitis dan gliosis di otak.

SARAN

Perlu penelitian lebih lanjut lesi histopatologi limpa dan otak ayam terinfeksi penyakit Tetelo yang dikaitkan dengan jenis pakan, lingkungan, dan faktor-faktor lain yang dalam kaitannya terhadap perubahan histopatologi yang ditimbulkan.

DAFTAR PUSTAKA

Adi AAAM, Astawa NM, Putra NM, Hakayashi KSA, Matsumoto Y. 2010. Isolation and Characterization of A Pathogenic Newcastle Disease Virus from A Natural Case in Indonesia. *J Vet Med Sci.* 72(3): 313-319

- Alexander DJ. 1991. *ND and Other Paramyxovirus Injection in Disease of Poultry*. USA: Iowa State University Press.
- Bhaiyat MI, Ochai K, Itakura C, Islam MA, Kida H. 1994. Brain Lesions in Young Broiler Chickens Naturally Infected with A Mesogenic Strain of Newcastle Disease Virus. *Avian pathol.* 23(4): 693-708.
- Eriwati. 2015. Kajian Patologi dan Imunohistokimia Kasus Lapang Newcastle Disease. www.ipb.com diakses pada 10 juni 2016.
- Jain NC. 1993. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea and Fibiger. Hal. 365-375
- Jordan FTW. 1990. *Poultry Disease*. Ed ke-3. London: Brailiere Tindal.
- Kencana GAY, Kardena IM. 2011. Gross Pathological Observation of Acute Newcastle Disease in Domestic Chicken. Prosiding Seminar Internasional Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia (PERMI) dan Internasional Union of Microbiological Societies (IUMS). 22-24 Juni 2011, Denpasar.
- Kommers GD, King DJ, Seal BC, Carmichael KP, Brown CC. 2002. Pathogenesis Of Six Pigoen-Origin Isolates Of Newcastle Disease Virus For Domestic Chickens. *Vet pathol.* 39(3):353-362
- Kiernan JA. 1990. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 2nd Edition. Pergamoss Press. Hal. 330-354.
- Mohammadamin OG, Qubih TS. 2011. Histopathology of Virulent Newcastle Disease Virus in Immune Broiler chickens Treated with IMBO. University of Mosul. *Iraqi Jurnal of Veterinary Scinens* 25(1): 9-13.
- Nakamura K, Ohtsu N, Nakamura T, Yamamoto Y, Yamada M, Mase M, Imai K. 2008. Pathologic and Immunihistokchemical Studies of ND in Broiler Chickens Vaccinated with ND: Severe Nonpurulent Encephalitis and Necrotizing Pancreatitis. *Vet Pathol.* 45: 928-933.
- Nakamura K, Otha Y, Abe Y, Imai K, Yamada. 2010. Pathogenesis of Conjunctivitis Caused by Newcastle Disease Viruses in Specific-Pathogen-Free Chickens. *Avian Pathol.* 33(3): 371-376.
- Office International des Epizooties (OIE). 2012. Terrestrial Manual. Chapter 2.3.14. Newcastle Disease. Pp. 1-9.
- Usman BA, Mani AU, El-yuguda AD, Diara SS. 2008. The Effect of Supplemental Ascorbic Acid on The Development of Newcastle Disease in Japanese Quail (*Coturnix Coturnic Japonica*) Exposed to Hight Ambient Temperature. *International jurnal of poultry science* 7(4): 328 – 332.
- Wakamatsu N, King DJ, Kapczynski DR, Seal BS, Brown CC. 2006. Experimental Pathogenesis for Chickens, Turkeys, and Pigeons of Exotic Newcastle Disease Virus from an Outbreak in California during 2002–2003. *Vet Pathol* 43: 925–933.
- Zachary JF. 2007. *Pathologic Basis Of Veterinary Disease*. Ed ke-4. St Louis Missouri. Mosby Elsivler Inc. 833-955