

# Infeksi *Avian Paramyxovirus* Tipe-1 pada Babi di Bali

(*AVIAN PARAMYXOVIRUS TYPE-1 INFECTION IN PIG IN BALI*)

Anak Agung Ayu Mirah Adi<sup>1</sup>, I Gusti Agung Arta Putra<sup>3</sup>,  
Bayu Setiabudi<sup>4</sup>, I Made Kardena<sup>1</sup>, Nyoman Mantik Astawa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Patologi, <sup>2</sup>Laboratorium Virologi,

<sup>4</sup>Mahasiswa Program Sarjana Kedokteran Hewan  
Fakultas Kedokteran Hewan,

<sup>3</sup>Laboratorium Anatomi dan Fisiologi, Fakultas Peternakan,  
Universitas Udayana, Jln. Sudirman Denpasar Bali,  
Telepon 0361 223791 email: aaa\_mirahadi@unud.ac.id

## ABSTRAK

*Virus avian paramyxovirus* tipe-1 (APMV-1) merupakan virus yang menyerang unggas dengan tingkat mortalitas bervariasi tergantung dari patotipe virus yang menginfeksi. Walaupun virus ini berasal dari unggas, tetapi virus ini dilaporkan juga dapat diisolasi dari babi. Untuk mengetahui adanya infeksi APMV-1 pada babi di Bali, maka perlu dilakukan kajian serologi terhadap keberadaan antibodi APMV-1 pada babi di Provinsi Bali. Kajian ini dilaksanakan dengan jalan menguji antibodi terhadap APMV-1, menggunakan metode *indirect enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) dengan antibodi sekunder *antipig Immunoglobulin-G horse radish peroksidase* (IgGHRP) serta divisualisasikan dengan substrat *tetramethylbenzidine* (TMB). Sampel serum yang memiliki nilai *optical density* (OD) di atas nilai *cut off* (COV) dinyatakan positif mengandung antibodi terhadap virus tetelo. Dari sejumlah 215 sampel serum babi yang berasal dari beberapa peternakan rakyat di delapan Kabupaten dan kota di Bali, yakni Kabupaten Jembrana, Tabanan, Badung, Kota Denpasar, Gianyar, Bangli, Karangasem dan Buleleng didapatkan sejumlah 174 sampel (80,93%) positif mengandung antibodi terhadap APMV-1, sementara itu dari sejumlah 127 sampel serum yang diambil di RPH pesanggaran didapatkan 125 sampel (98,42%) positif mengandung antibodi terhadap APMV-1. Berdasarkan kelompok umur, babi berumur lebih 8-9 bulan memiliki prevalensi reaktor lebih tinggi ( $p < 0.01$ ) dibandingkan yang berumur 3-6 bulan. Konfirmasi dengan uji *Western immunoblotting* dilakukan terhadap serum positif pada uji ELISA dan didapatkan pita protein khas dengan berat molekul 258 kDa sedangkan serum negatif tidak ditemukan pita protein spesifik APMV-1. Mengingat babi yang *disampling* tidak pernah divaksinasi maka adanya antibodi ini menandakan bahwa babi pernah terinfeksi virus APMV-1 secara alami.

Kata-kata kunci: APMV-1, ELISA, Western immunoblotting

## ABSTRACT

Avian Paramyxovirus type 1 (APMV-1) is a virus infecting birds with mortality level varies according to its pathotype. Although the virus is normally originated from birds, the recent report showed that it can be isolated from pig. In order to find out APMV-1 infections on pig in Bali, a serologic study was conducted to detect the antibody against APMV-1 among pigs in Bali. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the antibody against APMV-1 in pig sera. The serum samples with optical density value over the cut off value (COV) was considered as those containing Ab against APMV-1. Of 215 samples collected from traditional farms of eight regency and city in Bali namely Negara, Tabanan, Badung, Denpasar City, Gianyar, Bangli, Karangasem and Buleleng Regency, 174 samples (80,93%) were positive antibody against APMV-1. On the other hand, there were 125 (98,42%) positive sample among 127 sample collected from Pesanggaran abattoir. Furthermore, the 8-9 month age pigs showed that their antibody against APMV-1 were higher ( $p < 0.01$ ) than those of 3-6 months age. The ELISA positive samples were further confirmed using Western immunoblotting assay. The anti-APMV-1 antibody positive sera reacted with the virus specific protein band of 258 kDa and the negative sera did not react with the viral protein. As pig has never been vaccinated with APMV-1 vaccine, the presence of Ab against APMV-1 showed that the pigs were naturally infected with APMV-1.

Key words: APMV-1, ELISA, Western immunoblotting

## PENDAHULUAN

Infeksi *Avian Paramyxovirus* serotype-1 (APMV-1) menyebabkan penyakit yang disebut dengan penyakit tetelo atau *Newcastle disease* (ND). Penyakit ini merupakan suatu penyakit pernafasan dan sistemik yang bersifat akut dan mudah sekali menular serta menyerang berbagai jenis unggas terutama ayam. Penyakit ini dapat menyebar dengan cepat, menembus batas negara dan menyebabkan konsekuensi sosio-ekonomis dan implikasi perdagangan global, sehingga dimasukkan kedalam daftar A dari *Office International des Epizootica/OIE* (OIE, 2000). Virus ini sangat luas rentangan induk semangnya, dan dilaporkan setidaknya 241 spesies burung dari 27 ordo burung bisa diserang (Alexander, 1998). Infeksi APMV-1 virulen pada ayam sangat merugikan sementara itu itik diyakini sebagai reservoir virus yang potensial (Collins *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2007). Hal ini terlihat pada itik terinfeksi virus ND yang dapat mematikan ayam. Namun, menunjukkan gejala klinis yang ringan bahkan tidak menunjukkan gejala klinis sama sekali (Roy *et al.*, 2000). Banyak APMV-1 yang sudah diisolasi dari itik dan kebanyakan tergolong strain virus lentogenik (Kim *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009; Tsunekuni *et al.*, 2010). Secara umum infeksi APMV-1 hanya menimbulkan penyakit pada unggas walaupun secara *in vitro* APMV-1 dilaporkan dapat berkembang biak pada berbagai biakan jaringan lestari mamalia. Dalam dekade terakhir telah dilaporkan bahwa APMV-1 juga dapat diisolasi dari hewan lain selain unggas yakni babi di Tiongkok. Beberapa strain APMV-1 yang berhasil diisolasi dari babi di Tiongkok yakni Strain J101 (Ding *et al.*, 2010), strain Xiny 10 (Yuan *et al.*, 2012) serta satu strain HX01 dengan panjang genom lengkapnya 15.186 pb dan memiliki gugus asam amino tipikal strain lentogenik yakni dengan motif <sup>112</sup>-GRQGRL-<sup>117</sup> (Chen *et al.*, 2013). Sementara itu APMV-1 yang memiliki motif asam amino <sup>112</sup>-RRQKRF-<sup>117</sup> yang tipikal untuk strain yang virulen diisolasi dari manusia oleh Goebel *et al* (2007). Setelah ditelusuri ternyata secara genetik virus ini memiliki homologi yang sangat tinggi dengan APMV-1 asal burung merpati, yang umumnya ditemukan di Eropa dan Amerika Utara (Ujvari *et al.*, 2003 dan Ujvari, 2006).

Untuk mengetahui apakah babi di Bali telah terinfeksi APMV-1 secara alami, maka kajian serologi untuk mendeteksi keberadaan antibodi

terhadap virus ini dilakukan dengan metode *indirect* ELISA. Selanjutnya uji *Western immunoblotting* dilakukan untuk meneguhkan bahwa antibodi yang terdeteksi dengan ELISA itu bukan reaksi silang dengan kelompok *paramyxovirus* lain.

## METODE PENELITIAN

### Pengambilan Sampel Darah dan Penyiapan Serum

Teknik pengambilan sampel berdasarkan metode *purposive sampling*. Dalam penelitian ini, pengambilan sampel dan pemilihan wilayah berdasarkan hasil dari survei awal, yakni survei tentang kepemilikan ayam, itik bali, dan babi yang dipelihara dalam satu lokasi serta belum pernah divaksin dengan vaksin ND. Jumlah sampel yang diambil per-kabupaten/kota minimal 30. Sejumlah 215 sampel darah babi, yang diambil dengan metode *purposive sampling* dari beberapa peternakan skala rumah tangga di Kota Denpasar, Kabupaten Negara, Tabanan, Badung, Gianyar, Bangli, dan Karangasem. Sampel darah diambil dari babi yang dipelihara secara tradisional dengan kisaran umur anakan jantan (3-6 bulan) dan sejumlah 115 serum babi diambil dari rumah potong hewan (RPH) Pesanggaran, Kota Denpasar. Kisaran umur babi yang dipotong di RPH tersebut adalah 8-9 bulan dan semuanya babi jantan kastrasi.

### Teknik Pengambilan sampel darah.

Pada babi muda darah diambil dari *Vena auricularis* sedangkan pada babi dewasa darah diambil dari *V. cava anterior* maupun *V. auricularis* sebanyak 2,5 mL menggunakan *disposable syringe*. Untuk pemisahan serum, secepatnya dilakukan mengintak kandungan lemak dalam darah babi sangat tinggi sehingga tidak bagus jika disimpan dalam lemari pendingin.

### Uji *Indirect* ELISA

Metode *indirect* ELISA mengacu kepada prosedur standar yang telah dimodifikasi oleh Matsumoto *et al.*, (2008). Sumuran pada *plate* mikro ELISA 96, di-*coating* selama 16 jam pada suhu 4°C dengan antigen ND. Antigen ND yang digunakan adalah vaksin ND (Medivac-Medion Bandung) 1mL/sumuran dalam 50 mL 0,1M *carbonate buffer* pH 9,6. Setelah diinkubasi pada suhu 4°C selama 16 jam, *plate* mikro dicuci

sebanyak tiga kali dengan ELISA *washing buffer* (0,1% Triton X-100 dalam PBS). Semua sumuran dalam *plate* mikro selanjutnya diblok dengan 200  $\mu$ L susu skim 3% dalam PBS. *Plate* mikro diinkubasikan selama satu jam pada suhu 37° C, kemudian dicuci sebanyak tiga kali seperti. Ke dalam setiap sumuran kemudian ditambahkan serum babi yang akan diuji dengan pengenceran maksimum 1:200. Sebagai kontrol positif dipakai serum babi yang positif mengandung antibodi virus ND dengan uji *haemagglutination inhibition*/HI, Sebagai kontrol negatif dipakai dua sumuran yang tidak diisi antigen, dua sumuran yang tidak diisi antibodi I (tidak diisi serum babi sebagai ganti diisi PBS dan dua sumuran yang tidak diisi antibodi I dan II (antibodi II adalah *conjugate*). Setelah diinkubasi selama satu jam pada suhu 37°C dan pencucian sebanyak tiga kali, ke dalam sumuran *plate* mikro, ditambahkan *conjugate anti-pig IgG Horse Radish Peroxidase (HRP)* dengan pengenceran maksimum 1 : 2500. Selanjutnya *plate* mikro diinkubasikan kembali selama satu jam pada suhu 37°C, kemudian dicuci sebanyak tiga kali. Sesudah itu ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100  $\mu$ L *substrate solution* (1 Step™ Turbo TMB/*tetramethylbenzidine*-ELISA). Perubahan warna menjadi biru menandakan reaksi positif dan sebelum hasil dibaca direaksikan terlebih dahulu dengan *stop solution* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N dan warna berubah menjadi kuning. Hasil dibaca secepatnya pada ELISA *plate reader* dengan panjang gelombang 490 nm. Nilai *Optical Density* (OD) yang didapat kemudian ditabulasi. Penghitungan *Cut-off Value* (COV) diperlukan untuk menentukan batas antara nilai negatif dan positif. Nilai COV dihitung dari rataan nilai OD dari kontrol negatif yang ditambah enam kali standar deviasi (Matsumoto *et al.*, 2008). Untuk mengetahui apakah umur berpengaruh terhadap kejadian infeksi alami APMV-1, data seropositif antibodi dianalisis dengan uji non parametrik (Chi Square/X<sup>2</sup>) (Ghozali dan Castelan, 2002).

#### Uji *Western Immunoblotting* untuk Serum Babi

Untuk memperkuat bahwa antibodi yang terdeteksi dengan uji ELISA adalah benar antibodi terhadap APMV-1, bukan reaksi silang dengan *paramyxovirus* lain, maka dilaksanakan uji *Western Immunoblotting*. Uji ini terdiri atas dua tahapan yakni tahap I penyiapan antigen, penyiapan gel dan elektroforesis protein

dari antigen pada *sodium duodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE), sedangkan tahap II adalah tahapan reaksi *western immunoblotting*.

#### Penyiapan Antigen dan Elektroforesis Protein Antigen.

Virus stok  $\gamma$ cairan allantois terinfeksi virus ND  $\gamma$ disentrifus dingin dengan kecepatan 3000 rpm selama lima menit, supernatannya diambil. Sel darah merah ayam (RBC) disentrifus kemudian dibuang supernatannya. Butir RBC direaksikan dengan supernatan dari hasil sentrifugasi virus stok kemudian dihomogenkan dengan cara dibolak balik selama lima menit kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit supaya terjadi reaksi hemaglutinasi antara virus dengan RBC. Campuran kemudian disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama lima menit, supernatannya dibuang. Sedimennya dicuci dengan PBS sebanyak dua kali dengan cara disentrifus 1500 rpm selama lima menit. Setelah supernatannya dibuang, endapannya (RBC yang mengikat virus) kemudian ditambahkan dengan 100  $\mu$ L PBS dan diinkubasikan selama dua jam pada suhu kamar supaya virus lepas dari RBC akibat reaksi elusi. Setelah disentrifus supernatannya diambil untuk stok antigen. Antigen kemudian dielektroforesis.

#### *Western Immunoblotting*.

Protein virus yang sudah terpisah saat elektroforesis kemudian ditransfer ke dalam membran *nitrocellulose* kemudian dilacak dengan antibodi (serum yang uji), ikatan ini divisualisasikan dengan antibodi sekunder berlabel (*conjugate*) *anti-pig* Imunoglobulin-G alkaline fosfatase (IgG-AP) dan substrat 5-*bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine* (BCIP). Jika positif maka muncul pita (*band*). Adapun prosedurnya adalah sebagai berikut: Potongan (strip) *nitrocellulose* dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran. Kemudian kedalam masing-masing sumuran ditambahkan dengan 1 mL serum yang akan diuji (serum yang diuji diencerkan terlebih dahulu dengan susu skim 3% dengan perbandingan 1:100). Kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama satu malam. Kertas *nitrocellulose* dicuci dengan *tris buffer saline* (TBS) sebanyak lima kali, ditambahkan *conjugate* 1 : 1000 dalam TBS dan diinkubasi satu jam pada suhu 37°C. Strip dicuci dengan TBS sebanyak lima kali, dilanjutkan dengan penambahan substrat ke

masing-masing *well* sebanyak 1 mL, kemudian diinkubasi pada suhu ruang sampai munculnya pita protein. Reaksi dihentikan dengan air kran.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Kisaran nilai seropositif antibodi perkabupaten/kota bervariasi dari 66,6% sampai dengan 95% (Tabel 1). Presentase sampel positif dari seluruh sampel per kabupaten disajikan pada Tabel 1.

Sementara itu jika seropositif antibodi APMV-1 pada babi usia muda (usia berkisar 3-6 bulan) dibandingkan dengan seropositif antibodi pada babi usia lebih dari delapan bulan yang dipotong di RPH didapatkan nilai seropositif antibodi lebih tinggi pada babi usia lebih tua (Tabel 2).

Insiden infeksi pada babi yang lebih tua ternyata lebih tinggi dibandingkan dengan babi muda, ini diyakini ada hubungan rentang waktu kontak dengan sumber penularan virus. Makin dewasa makin banyak peluang babi berkontak dengan agen, mengingat situasi perternakan di

Bali memungkinkan babi untuk berkontak dengan reservoir alami APMV-1 seperti itik dan burung liar, maupun dengan ayam di sekitarnya. Keadaan ini juga didukung dengan sistem perternakan tradisional di Bali yang menunjukkan bahwa ternak unggas dipelihara bersama/berdekatan dengan ternak babi (Adi, 2011)

Jika dilihat per kabupaten, kota, ternyata di Klungkung dan Karangasem insiden kerjadiannya paling tinggi, belum diketahui apa penyebabnya, mengingat jika dibandingkan dengan seroprevalensi pada ternak selain babi, tidak nampak ada hubungan antara kejadian pada itik dan ayam dengan tingginya terjadi pada babi di kedua kabupaten tersebut (Adi *et al.*, 2013).

Tingginya insiden pada babi, dapat disebabkan oleh waktu hidup yang lebih lama dibandingkan unggas, sehingga virus mempunyai peluang untuk berbiak lebih lama pada babi tanpa menimbulkan lesi yang berarti. Kalau virus APMV-1 mampu berbiak pada babi, kemungkinan babi bisa sebagai sumber penularan kepada unggas di sekitarnya

Tabel 1.0 Presentase positif antibodi APMV-1 Babi, dihitung perkabupaten/kota di Provinsi Bali.

Kabupaten/Kota	Seropositif antibodi APMV-1 pada Babi		
	n	seropositif	persentase (%)
Jembrana	30	23	76,60 (23/30)
Tabanan	30	26	86,60 (26/30)
Badung	30	20	66,60 (20/30)
Kota Denpasar	30	26	86,60 (26/30)
Gianyar	30	20	66,60 (20/30)
Bangli	10	8	80,00 (8/10)
Klungkung	20	19	95,00 (19/20)
Karangasem	20	19	95,00 (19/20)
Buleleng	15	13	86,80 (13/15)

Keterangan : AMPV-1 = *Avian Paramixovirus* serotype 1

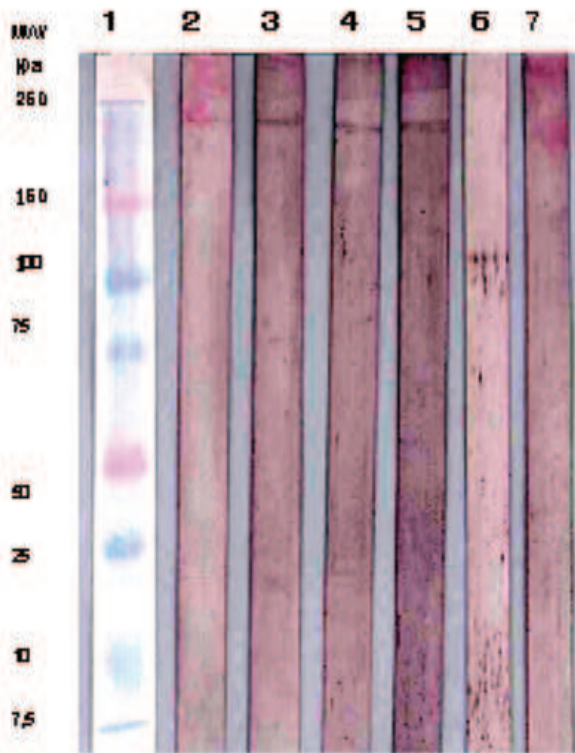
Tabel 2. Persentase kejadian positif APMV-1 pada babi yang lebih tua sangat nyata lebih tinggi ( $p < 0.01$ ) dibandingkan babi muda.

Umur	Positif	Negatif	Total	Persentase (%)
3-6 bulan	174	41	215	80,93
>8 bulan	125	2	127	98,42
Total	299	43	342	87,43

Keterangan : AMPV-1 = *Avian Paramixovirus* serotype 1

sehingga hal ini perlu mendapat perhatian lebih lanjut.

Hasil uji *Western immunoblotting* (Gambar 1), terhadap serum yang positif antibodi APMV-1 menunjukkan adanya pita protein (248 kDa). Salah satu protein spesifik APMV-1 yang



Gambar 1. Hasil *Western Immunoblotting* serum babi yang memiliki nilai OD lebih tinggi dan lebih rendah dari COV. Protein antigen dielektroforesis dengan SDS-PAGE, ditransfer ke membran nitroselulose direaksikan dengan serum babi, kemudian kompleks antigen antibodi divisualisasikan dengan menambahkan antibodi sekunder antipig IgG-AP dan substrat BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate *p-toluidine*). Pita hitam berukuran 248 kDa merupakan protein L (*Large polymerase*), nampak jelas terlihat pada sampel dengan nilai OD diatas COV (line 2,3,4 dan 5) Keterangan: 1 Marker; 2. Badung2 (OD=1,53); 3. Jembrana 7 (OD=1,599); 4. Kota Denpasar 9 (OD=1,315); 5. RPH 10 (OD=1,256); 6. Badung 19 (OD=0,159); 7. RPH 43 (OD=0,288).

memiliki bobot molekul 248,0-248,9 kDa adalah protein L (Adi, 2011; Linde *et al.*, 2010; Paldurai *et al.*, 2010). Protein ini juga dinyatakan sebagai penentu keganasan dan yang mempunyai bobot molekul paling tinggi yang berkisar antara 248,0-248,9 kDa (Rout dan Samal, 2008; Wise *et al.*, 2004) dibandingkan dengan protein F dan HN yang bobot molekulnya berturut turut 59 dan 63 kDa (Adi, 2011; Linde *et al.*, 2010; Mohamed *et al.*, 2009; Paldurai *et al.*, 2010). Maka muncul pertanyaan apakah antibodi yang muncul pada babi di Bali ini sebagai respons terhadap infeksi strain virus yang velogenik, sehingga menjadi berbeda kejadiannya dengan APMV-1 yang diisolasi dari babi di Tiongkok yang merupakan strain yang lentogenik. Penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi dan mengidentifikasi APMV-1 pada babi di Bali serta infeksi buatan dengan APMV-1 virulen dan avirulen, perlu untuk diteliti.

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa antibodi APMV-1 dapat ditemukan pada babi di Bali. Hal ini menunjukkan adanya infeksi APMV-1 secara alami pada babi di Bali.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai dari Hibah Penelitian Desentralisasi Tahun anggaran 2013 dengan no kontrak 175.47/UN14.2/PNL.01.03.00/2013. Penulis berterimakasih kepada LPPM Universitas Udayana yang telah memfasilitasi pelaksanaan proyek hibah ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adi AAAM. 2011. Biological and molecular studies on a pathogenic Newcastle disease virus isolated from a natural case in Indonesia. Disertasi. Tokyo. The University of Tokyo.
- Adi AAAM, Putra IGAA, Kardena IM. 2013. Studi serologik infeksi virus *Newcastle disease* pada ayam kampung, itik bali dan kemungkinan babi sebagai *viral amplifying host*. Laporan Tahunan Hibah Fundamental-Dikti Tahun I.

- Alexander DJ. 1998. Newcastle disease virus and other avian paramyxo-viruses. In D. E. Swayne DE. (Ed) *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*. The American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA. Pp. 156–163.
- Chen S, Hao H, Wang X, Due E, Liu H, Yang T, Liu Y, Fu X, Zhang P, Yang Z. 2013. Genomic characterisation of lentogenic Newcastle disease virus strain HX01 isolated from sick pigs in China. *Genes* 46(2): 264-270.
- Collins MS, Bashiruddin JB, Alexander DJ. 1993. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Arch. Virol* 128: 363–370.
- Ding ZY, Chong L, Chang S, Wang G, Wang Z, Zhang Q, Wo H, Sun YZ. 2010. Genetic analysis of avian paramyxovirus-1 (Newcastle disease virus) isolates obtain from swine populations in China related to commonly utilized commercial vaccine strains. *Vir Genes* 41: 369-376.
- Goebel SJ, Taylor J, Barr BC, Kiehn TE, Malaspana HCR, Hedvat CVH, Wilson KAR, Kelly CD, Davis SW, Swamsonoff WA, Hurst KR, Behr MJ, Masters PS. 2007. Isolation of avian paramyxovirus 1 from patient with a lethal case of pneumonia. *J virol* 81(22): 12709-12714.
- Ghozali I, Castelan JR. 2002. *Statistika Non Parametrik, Teori dan Aplikasi dengan Program SPSS*. Semarang. Badan Penerbit Universitas Diponegoro.
- Kim LM, King DJ, Curry PE, Suarez DL, Swayne DE, Stallknecht DE, Slemmons RD, Pedersen JC, Senne DA, Winker K, Afonso CL. 2007. 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: 12641–12653.
- Lee EK, Jeon WJ, Kwon JH, Yang CB, and Choi KS. 2009. Molecular epidemiological investigation of Newcastle disease virus from domestic ducks in Korea. *Vet Microbiol* 134: 241–248.
- Linde AM, Munir M, Zohari S, Stahl K, Baule C, Renstrom L, Berg M. 2010. Complete genome characterisation of a Newcastle disease virus isolated during an outbreak in Sweden in 1997. *Virus genes* 41: 165-173.
- Matsumoto Y, Adi AAAM, Erawan IGMK, Hayashi Y. 2008. Serological studies on Bali original ducks for Japanese encephalitis virus (JEV) infection and the impact of pigs the amplifying host for JEV. in *Proceeding of : Toward harmonisation between development and environmental conservation in biological production*. 28-29 February 2008. Tokyo. The University of Tokyo. p. 280
- Mohamed AMH, Kumar S, Paldurai AA, Megahed MM, Ghanem IA, Lebdah MA, Samal SK. 2009. Complete genome sequence of virulent Newcastle disease virus isolated from an outbreak in chicken in Egypt. *Virus Genes*: DOI 10.1007/s11261-009-0385-7.
- OIE. 2000. Animal disease://<http://www.oie.int/doc/distribution/diakses> 12 Juli 2013
- Paldurai A, Kumar S, Nayak B, Samal SK. 2010. Complete genome sequence of highly virulent neurotropic Newcastle disease virus strain Texas GB. *Virus Genes* 41: 67-72.
- Rout S N, Samal S K. 2008. The Large Polymerase 623 Protein is associated with the virulence of Newcastle disease virus. *J Virol* 82: 7828-7836.
- Roy P, Venugopalan AT, Manvell R. 2000. Characterization of Newcastle disease viruses isolated from chickens and ducks in Tamilnadu, India. *Vet Res Commun* 24: 135–142.
- Tsunekuni R, Ito H, Otsuki K, Kida H, Ito T. 2010. Genetic comparisons between lentogenic Newcastle disease virus isolated from waterfowl and velogenic variants. *Virus Genes* 40: 252–255.
- Ujvari DE, Wehmann EF, Kaleta OW, Savic V, Nagy E, Czifra G, Lomniczi B. 2003. Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeon. *Vir Res* 96: 63-73.

- Ujvari D. 2006. Complete nucleotide sequence of IT-227/82 an avian paramyxovirus type-1 strain of pigeons (*Columba livia*). *Virus genes* 32: 49-57.
- Wise MG., Sellers HS, Alvarez R., Seal BS. 2004. RNA-dependent RNA polymerase gene analysis of worldwide Newcastle disease virus isolates representing different virulence types and their phylogenetic relationship with other members of the paramyxoviridae. *Virus Res* 104: 71–80.
- Yuan X, Wang Y, ang J, Xu H, Zhang Y, Qin Z, Al H, Wang J. 2012. Genetic and biological characterizations of a Newcastle disease virus from swine in China. *Virology* doi 1743-422x.