

Variasi Genetik Gen Penyandi Protein Fusi dari *Avian Paramyxovirus Tipe I* di Bali

(GENETIC VARIATION OF GENE ENCODING FUSION PROTEIN
OF AVIAN PARAMYXOVIRUS TYPE-I IN BALI)

I Gusti Agung Arta Putra¹, Anak Agung Ayu Mirah Adi²,
Nyoman Mantik Astawa³

¹Laboratorium Fisiologi dan Anatomi, Fakultas Peternakan,
²Laboratorium Patologi Veteriner, ³Laboratorium Virologi Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana
Jalan Sudirman, Denpasar, Indonesia
Telpon : 0361-702771, email : artaputra@unud.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui variasi genetik gen penyandi protein fusi (F) dari virus *Avian Paramyxovirus* tipe-1 (APMV-1) yang diisolasi dari kasus penyakit tetelo/*Newcastle Disease* (ND) pada ayam dari peternakan ayam di wilayah Provinsi Bali sepanjang tahun 2014. Kelima isolat yang diisolasi dari kasus ayam sakit/mati yang dicurigai terinfeksi oleh APMV-1 dan negatif terhadap infeksi flu burung/*Avian Influenza Virus* (AIV) adalah : D5/AK/2014, B1/AK/2014, T1/ARP/2014 G1/AK/2014, dan K1/ARP/2014. Analisis sekuen terhadap kelima isolat tersebut menunjukkan bahwa tiga isolat yang diisolasi dari ayam kampung (AK) yaitu D5/ AK/2014, B1 AK/2014 dan G1/AK/2014 memiliki jarak genetik, 11,1%, 10,2%, dan 8,2% jika dibandingkan dengan sekuen nukleotida Bali-1/07 yang diisolasi dari Kabupaten Karangasem pada tahun 2007. Sementara itu isolat T1/ARP/2014 dan K1/ARP/2014 sama-sama memiliki jarak genetik 20,1% jika dibandingkan dengan sekuen isolat Bali-1/07. Susunan asam amino pada situs pemotongan (*cleavage sites*) enzim protein F untuk tiga isolat yaitu D5, B1 dan G1 adalah R-R-Q- K-R-F, yang merupakan ciri khas dari virus virulen. Sementara itu dua isolat yaitu T1 dan K1 yang diisolasi dari ayam ras petelur (ARP) memiliki susunan asam amino G- R-Q-G-R-L, yang merupakan ciri khas virus galur avirulen. Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa isolat APMV-1 yang diisolasi dari kasus penyakit ND pada ayam sepanjang tahun 2014 disebabkan oleh isolat virulen dan tergolong ke dalam genotipe VII, di samping itu juga, ditemukan dua isolat yang tergolong kedalam isolat avirulen

Kata-kata kunci: *avian paramyxovirus* tipe 1, gen protein F, ND, jarak genetik, sekuen

ABSTRACT

This study aims to determine the genetic variation of gene encoding fusion (F)-protein of avian paramyxovirus (APMV) type-1 isolated from chickens suffering of Newcastle disease (ND) found in a chicken farm in the province of Bali throughout the year 2014. There are five isolates got from sick chickens cases/death suspected of being infected by APMV -1, but negative for avian influenza virus (AIV) infection i.e: D5/AK/2014, B1/AK/2014, T1/ARP/2014, G1/AK/2014, and K1/ARP/2014. Sequence analysis of the five isolates showed that three isolates of D5, B1 and G1 have a genetic distance of 11,1%, 10,2% and 8,2% when compared to the nucleotide sequence of Bali-1/07 isolated previously from Karangasem regency in 2007. Meanwhile, the genetic distance of T1 and K1 isolates are 20,1% and 18% respectively as compare to the sequence of the Bali-1/07 isolate. The composition of amino acids at the cleavage sites enzyme of F-protein for 3 isolates of D5, B1 and G1 are R-R-Q- K-R-F, which is the typical characteristic of virulent virus strain. Meanwhile, two isolates i.e T1 and K1 got from layer chicken had the amino acid sequence of G- R-Q-G -R-L, which is group into avirulent virus strains. It was concluded that APMV-1 isolates found in ND cases in the year of 2014 were caused by virulent isolate and were grouped into VII-genotype. Furthermore, It was found that there were two avirulent isolates

Key words: avian paramyxovirus type 1, F-protein gene, ND, genetic distance.

PENDAHULUAN

Penyakit tetelo (*Newcastle disease/ND*) adalah salah satu penyakit unggas yang sangat merugikan industri perunggasan di seluruh dunia. Penyakit tetelo disebabkan oleh *Avian Paramyxovirus* tipe 1 (APMV-1) galur yang virulen. Penyakit ini merupakan suatu penyakit pernafasan yang bersifat sistemik, 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 ke dalam daftar A dari *Office International des Epizootica* (OIE). Penyakit ini endemis di berbagai belahan dunia termasuk Indonesia (Adi *et al.*, 2010).

Genom APMV-1 terdiri atas enam *open reading frame* (ORF) yang menyandi enam protein, yaitu nukleoprotein (NP), fosfoprotein (P), protein matriks (M), protein fusi (F), *hemagglutinin-neuraminidase* (HN), dan protein polimerase RNA (L) dalam urutan (3'-NP-P-M-F-HN-L-5'). Protein F yang berfungsi sebagai protein fusi yang menyatukan amplop virus dengan membran sel. Protein tersebut berfungsi secara langsung mempertautkan amplop virus dengan membran sel terinfeksi. Gen penyandi protein F memiliki panjang sekitar 1.790 nukleotida (nt) yang memiliki *open reading frame* (ORF) yang menyandi daerah pemotongan (*cleavage sites*). Daerah pemotongan protein F berperan dalam fusi atau penetrasi partikel virus dalam suatu sel. Virus ND (VND) virulen memiliki sekuen daerah pemotongan ¹¹²R/K-R-Q-K/R-R-F¹¹⁷, sedangkan VND yang avirulen memiliki sekuen ¹¹²G/E-K/R-Q-G/E-R-L¹¹⁷ (Yusoff dan Tan, 2001; OIE, 2004).

Vaksinasi untuk mencegah munculnya ND telah dilakukan dari beberapa dekade menggunakan virus APMV-1 galur yang avirulen. Bentuk vaksin yang umum digunakan adalah vaksin hidup dan vaksin mati (*killed oil based vaccines*). Walaupun vaksinasi sudah merupakan hal yang umum dilakukan untuk mencegah wabah penyakit ini, namun kejadian ND masih terjadi di berbagai belahan dunia termasuk Indonesia (OIE, 2014). Masih belum diketahui secara pasti apakah penggunaan vaksin hidup secara berlebihan dapat menciptakan kondisi yang memungkinkan terjadinya modifikasi genetik dari virus yang patogenik sehingga menciptakan galur yang tidak dapat dinetralkan oleh antibodi hasil vaksinasi.

Ataukah riwayat vaksinasi yang belum optimum dapat mengakibatkan ayam menjadi terinfeksi oleh virus vaksin dan virus lapang yang dapat mengubah virulensi virus (Miller, 2010).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui variasi genetik dan hubungan filogenetik gen penyandi protein F virus APMV-1 yang diisolasi dari kasus ND. Tujuan lainnya adalah untuk mengembangkan *data base* terhadap informasi keragaman genetik dari APMV-1 di Bali.

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel Organ.

Sampel berupa ayam sakit/mati yang diduga disebabkan oleh infeksi APMV-1 diambil dari kejadian penyakit yang diduga ND dari berbagai wilayah di Bali. Mengingat gejala klinis ND dan penyakit flu burung/*avian influenza/AI*) sangat sulit dibedakan, maka sebelum diputuskan untuk mengambil sampel, diadakan pemeriksaan cepat untuk penyakit AI dengan Kit *Rapid Test* untuk AI. Sampel ayam yang memberikan reaksi negatif terhadap AI kemudian dinekropsi dan sampel organ diambil untuk diproses lebih lanjut.

Isolasi dan Propagasi Virus.

Organ ayam berupa otak, paru-paru, limpa, usus dan bursa Fabricius diambil secara aseptis dihancurkan dengan *mortar* steril kemudian inokulum yang didapat diinokulasikan pada telur ayam bertunas (TAB). Setelah embrio mati, cairan *allantois* dipanen dan diuji dengan *hemagglutination* (HA) dan *hemagglutination inhibition* (HI) untuk mengkonfirmasi ada tidaknya virus digunakan prosedur standar.

Isolasi RNA dan Reaksi Transkripsi Balik (*Reverse Transcriptase*).

Asam inti (RNA) virus ND diekstrak dari cairan *allantois* dengan metode Trizol, dengan perbandingan 250 µL cairan *allantois* ditambah 750 µL Trizol. Setelah divorteks selama beberapa saat, campuran dibiarkan pada suhu kamar selama lima menit. Ke dalam campuran, kemudian ditambahkan 200 µL kloroform, setelah divorteks didiamkan selama 15 menit. Kemudian, campuran disentrifugasi selama 15 menit pada 36000 rpm dan bagian supernatan diambil. Selanjutnya, ditambahkan 500 µL isopropil alkohol ke dalam cairan supernatan dan kembali didiamkan selama 10 menit.

Campuran kembali disentrifugasi dengan kecepatan 25000 rpm selama 10 menit dan supernatan dibuang. Pelet kemudian dicuci dengan 1000 μ L alkohol 70%, dan disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm. Supernatan dibuang, RNA dikeringkan dan disuspensikan dalam aquades yang bebas enzim RNase (*diethyl pyro carbonat treated water*). Konsentrasi RNA dalam sampel yang didapat diukur dengan spektrofotometer dan sampel RNA selanjutnya disimpan pada suhu -20°C

Amplifikasi gen F

Sepasang primer yang akan mengamplifikasi fragmen gen F pada posisi 4680-4990 digunakan pada reaksi *one step reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR). Susunan nukleotida sepasang primer tersebut adalah sebagai berikut: F10s⁴⁶⁶¹ G C A G C T G C A G G G A T T G T G G T⁴⁶⁸⁰ dan F10s⁴⁹⁹⁰ C T T T G A G C A G G A G G A T G T T G⁵⁰¹⁰ (Nanthakumar *et al.*, 2000). Adapun komposisi dan kondisi reaksi RT-PCR, sebagai berikut: R-mix (dNTP, MgSO₄ dan bufer) 5 μ L, primer depan dan primer belakang 0,6 μ L, *SuperScriptTM III onestep RT-PCR System with Platinum® Tag DNA Polymerase* (Invitrogen) 0,25 μ L, aquabides 2,55 μ L dan virus RNA 1 μ L. Tabung kemudian dimasukkan ke dalam mesin *thermocycler* dan diprogram sebagai berikut : *reverse* RNA menjadi cDNA pada suhu 50°C selama satu jam, *pre-denaturasi* pada suhu 95°C selama tujuh menit dan *denaturasi* 94°C selama 45 detik. Selanjutnya proses *annealing* pada suhu 55°C selama 45 detik dan tahap *extension* pada suhu 72°C selama 30 detik. Satu siklus reaksi yaitu tahap *denaturasi*, *annealing*, dan *extensions* diulangi sampai 40 kali (siklus). Terakhir tahap penyempurnaan kerja enzim pada suhu 72°C selama lima menit. Setelah tahapan penyempurnaan selesai, maka *thermo cycler* berada pada suhu 20°C. Produk RT-PCR yang didapat kemudian dicampur dengan dua *loading dye* sebanyak enam kali, kemudian dielektroforesis pada agarose 2% selama 25 menit dengan *running buffer* TAE (*Tris Asetic EDTA*) satu kali, kemudian divisualisasikan dengan larutan *ethidium bromide* (0,5 mg/mL).

Sekuensing dan Analisis Sekuen .

Produk RT-PCR dikirim ke Lembaga Eijkman, Jakarta. untuk disekuensing. Runutan nukleotida hasil sekuensing virus ND isolat lapang dan turunan asam aminonya disepadankan dan dibandingkan dengan sekuen

ND yang diakses dari *GenBank* dengan *ClustalW Method* dari MEGA 4. Dilanjutkan dengan analisis jarak genetik dengan *Pairwise Distance Method* dan filogenetik menggunakan UPGMA MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil sekuensing, didapatkan susunan nukleotida ke lima isolat, sehingga dapat ditentukan jarak genetik isolat tersebut dengan virus pendahulunya adalah sebagai berikut: D5/AK/2014, B1/AK/2014 dan G1/AK/2014 memiliki jarak genetik, 11,1%; 10,2%; dan 8,2% jika dibandingkan dengan sekuen nukleotida Bali-1/07 yang diisolasi dari Kabupaten Karangasem pada tahun 2007 sementara itu isolat T1/ARP/2014 dan K1/ARP/2014 sama-sama memiliki jarak genetik 20,1% jika dibandingkan dengan sekuen isolat Bali-1/07 (Tabel 1). Hasil sekuen nukleotida setelah RT-PCR telah banyak digunakan oleh peneliti untuk menetapkan perbedaan genetik dan genotipe virus APMV-1 (Sakaguchi *et al.*, 1989; Seal *et al.*, 1995; Lomniezi *et al.*, 1998).

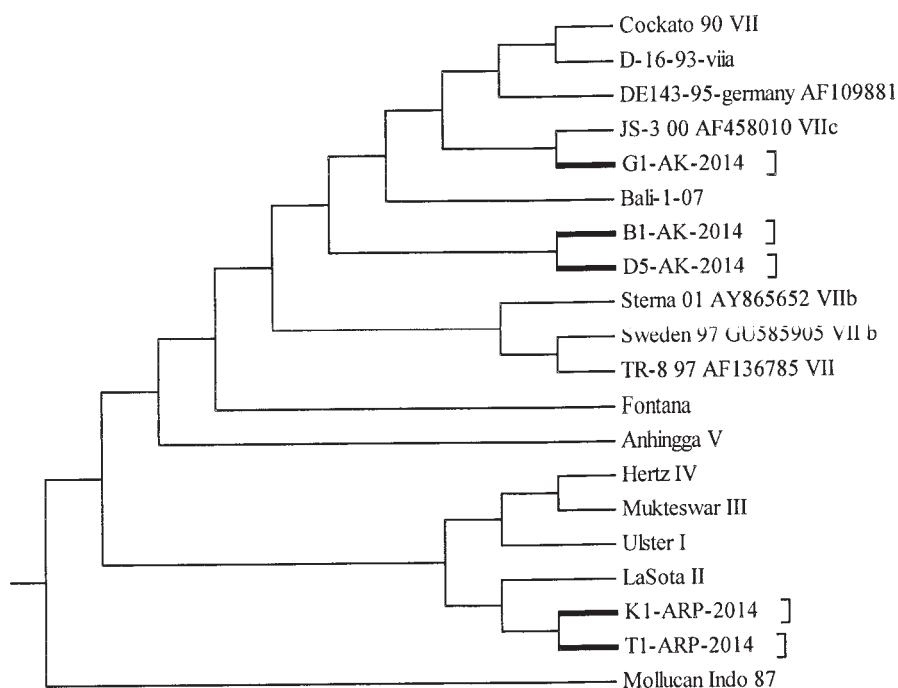
Perubahan susunan genom virus RNA yang tidak bersegmen dan berantai negatif terjadi akibat kesalahan polimerasi (Adi dan Astawa, 2014). Jika dibandingkan dengan susunan nukleotida virus Bali-1/07 utamanya pada segmen gen *F*, nampak bahwa isolat virulen pada penelitian ini yang diisolasi pada tahun 2014 memiliki persentase perbedaan nukleotida yang berkisar 8-11% (Tabel 1) dan susunan asam amino pada situs penentu keganasan tidak mengalami perubahan (Tabel 2). Hal tersebut menandakan isolat yang diisolasi pada tahun 2014 masih merupakan varian virus sebelumnya. Laju mutasi genom pada APMV-1, merupakan hal yang tidak dapat dihindari, beberapa peneliti menyimpulkan, bahwa laju mutasi lebih akibat faktor waktu dibandingkan dengan faktor spasial (de Leeuw *et al.*, 2003). Hal ini bertolak belakang dengan laporan penelitian yang menyatakan bahwa tidak ada pengaruh temporal terhadap ekspresi genom APMV-1 (Toyoda *et al.*, 1987), yang menandakan tidak adanya variasi susunan nukleotida. Pernyataan tersebut didukung dengan hasil penelitian yang menyatakan, bahwa perbandingan homologi APMV-1 isolat JP/Ibaraki/SG106/99 dibandingkan dengan isolat lain yang telah diidentifikasi pada waktu yang berbeda (dimensi temporal) memiliki persentase

AK/2014, B1 AK/2014 dan G1/AK/2014 menunjukkan motif ¹¹² RRQKRF¹¹⁷ (Tabel 2). Menurut kriteria OIE (2014) APMV-1 dikategorikan virulen jika: protein *fusion* (F) memiliki tiga atau lebih asam amino basa pada posisi 113-116 dan asam amino fenilalanin pada posisi 117. Susunan asam amino pada ketiga isolat tersebut mendukung hasil analisis filogenetik, bahwa isolat tersebut termasuk isolat yang virulen atau genotipe VII. Sementara itu, dua isolat T1/ARP/2014 dan K1/ARP/2014 susunan asam amino di situs-situs penyibakan protein *F*-nya adalah ¹¹²GRQGRL¹¹⁷ motif asam amino tunggal dengan leusin (L117) pada N terminalnya khas untuk APMV-1 yang bersifat avirulen. Hasil analisis asam amino memperkuat bahwa kedua isolat tersebut memang isolat avirulen satu kelompok dengan galur virus vaksin LaSota yang tergolong pada genotipe II (Gambar 1).

Berdasarkan hasil penelitian ini, ada fenomena menarik yang perlu mendapat perhatian, yaitu isolat T1 dan K1 yang diisolasi dari ayam ras petelur susunan nukleotidanya sangat mirip dengan virus LaSota, yaitu virus galur avirulen yang digunakan untuk vaksin.

Tampak jelas dalam pohon filogenetik, bahwa isolat yang diisolasi dari ayam ras petelur ini berada satu *clade* dengan virus vaksin (Gambar 1). Mengingat sifat alami virus RNA yang tingkat mutasinya tinggi, dan adanya peluang untuk terjadinya evolusi virus akibat rekombinasi gen antara genotipe II dan VII (Qin *et al.*, 2008), maka menarik untuk diteliti lebih lanjut apakah fragmen gen lainnya juga satu *clade* dengan galur vaksin, ataukah isolat tersebut sebenarnya merupakan *revertan* dari galur vaksin. Adanya perbedaan jarak genetik yang cukup jauh antara virus lapang dengan virus vaksin akan memengaruhi keberhasilan vaksinasi. Keberhasilan vaksinasi sangat ditentukan oleh pengenalan antibodi terhadap virus lapang pascavaksinasi. Pengenalan antibodi dipengaruhi oleh homologi virus vaksin dengan virus lapang (Hughes, 2009; Perozo *et al.*, 2012). Untuk mengetahui kemungkinan adanya rekombinasi antar gen virus ganas dengan virus vaksin maka sekuen genom lengkap kedua isolat tersebut harus dilakukan.

Keanekaragaman virus ND (antigenik, patogenisitas, dan genetik) perlu dikaji untuk menjawab kenapa kasus ND selalu saja muncul?



Gambar 1. Hubungan filogenetik antara isolat avian paramyxovirus tipe-1 yang diisolasi dari kasus yang diduga ND pada ayam pada tahun 2014 di Bali. Analisis menggunakan sekuen nukleotida pada fragmen gen *F*. Filogram dibuat dengan program UPGMA dari MEGA 4.

Padahal vaksinasi sudah dilakukan secara teratur kalau secara antigenik virus ND beragam, dan kekebalan yang diinduksi oleh vaksin tidak mampu menetralkan virus ND di lapangan, berarti perlu upaya baru untuk pengembangan vaksin.

SIMPULAN

Isolat APMV-1 yang diisolasi dari kasus penyakit ND pada ayam sepanjang tahun 2014 disebabkan oleh isolat virulen dan yang tergolong ke dalam genotipe VII serta memiliki jarak genetik yang berkisar antara 8-11% , jika dibandingkan dengan isolat virulen Bali-1/07 yang diisolasi pada tahun 2007. Ditemukan dua isolat yang tergolong dalam isolat avirulen dengan jarak genetik 20,1% jika dibandingkan dengan sekuen isolat Bali-1/07

SARAN

Mengingat adanya perbedaan jarak genetik yang cukup jauh antara virus lapang dengan virus vaksin ND yang akan memengaruhi keberhasilan vaksinasi maka penelitian tentang keragaman genetik virus yang bersirkulasi di lapangan perlu secara berkala dilakukan.

Isolat T1/ARP/2014 dan K1/ARP/2014 memiliki sekuen sama dengan virus vaksin pada fragmen gen *F*, maka menarik untuk diteliti lebih lanjut apakah fragmen gen lainnya juga satu *clade* dengan galur vaksin, ataukah isolat tersebut sebenarnya merupakan *revertan* dari galur vaksin.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, sesuai dengan surat perjanjian penugasan pelaksanaan penelitian Nomor : 150 /UN 1 4.2/ PNL.01.03.00/2015, tanggal 3 Maret 2015

DAFTAR PUSTAKA

- Adi AAAM, Astawa NM. 2014. *Avian Paramyxovirus Tipe 1: Biologi dan Polimorfisme Genetik*. Denpasar. Swasta Nulus. Hlm.40
- Adi A AAM, Astawa NM, Putra KSA, Hayashi, Y, Matsumoto Y. 2010. Isolation and characterization of a pathogenic Newcastle disease virus from a natural case in Indonesia. *J Vet Med Sci* 72: 313–319.
- Adi AAAM, Astawa NM, Putra KSA, Matsumoto Y. 2008. Deteksi virus penyakit tetelo isolat lapangan dengan metode nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Veteriner* 9: 128-134.
- Czegl'edi A, Ujvari D, Somogyia E, Wehmanna E, Werner O, Lomniczi B. 2006. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle Disease Virus) and evolutionary implications. *Virus Res* 120: 36-48.
- de Leeuw OS, Hartog L, Koch G, Peeters B. 2003. Effect of fusion protein cleavage site mutations on virulence of Newcastle disease virus: Non-virulent cleavage site mutants revert to virulence after one passage in chicken brain. *J Gen Virol* 84: 475-484.
- Garcia SC, Lopez RN, Morales R, Olvera MA, Marquez MA, Merino R, Miller PJ and Afonso CL. 2013. Molecular Epidemiology of Newcastle Disease in Mexico and the Potential Spillover of Viruses from Poultry into Wild Bird Species. *Appl Environ Microbiol* 79: 4985-4992.
- Hughes AL. 2009. Relaxation of Purifying Selection on Live Attenuated Vaccine Strains of the Family Paxamyxoviridae. *J Vaccine* 27: 1685–1690.
- Lomniezi B, Wehmann E, Herczeg J, Ballagi-Pordany A, Kaleta EF, Werner O, Meulemans G, Jorgensen OH, Mante AP, Gielkens ALJ, Capua I, Damoser J. 1998. Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Arch Virol* 143: 49-64.

- Miller PJ, Decanini EL, Afonso CL. 2010. Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infect Gen Evol* 10: 26–35.
- Nanthakumar T, Kataria RS, Tiwari AK, Butchaiah G, Kataria JM. 2000. Pathotyping of Newcastle disease viruses by RT-PCR and restriction enzyme analysis. *Vet Res Com* 24: 275-286.
- OIE. 2014. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 5th. Edition, Chapter 2. 1. 15. Newcastle disease. (<http://www.oie.int/manual>).
- Perozo F, Marcano R, Afonso CL. 2012. Biological and Phylogenetic Characterization of a Genotype VI Newcastle Disease Virus from Venezuela: Efficacy of Field Vaccination. *J Clin Microbiol* 50: 1204–1208.
- Qin ZM, Sun L, Ma B, Cui Z, Zhu Y, Kitamura Y, Liu W. 2008a. F gene recombination between genotype II and VII Newcastle disease virus. *Virus Res* 131: 299–303.
- Romer-Oberdorfer A, Werner O, Veits J, Mebatison T, Mettenleiter TC. 2003. Contribution of the length of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenicity. *J Gen Virol* 84: 3121–3129.
- Sakaguchi T, Toyoda T, Gotoh B, Inocencio NM, Kuma K, Miyata T, Nagai Y. 1989. Newcastle disease virus evolution. I. Multiple lineages defined by sequence variability of the haemagglutinin-neuraminidase gene. *Virology* 169: 260–272.
- Seal BS. 2004. Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the fusion protein and hemagglutination-neuraminidase protein genes among Newcastle disease virus isolates. Phylogenetic relationships among Paramyxovirinae based on attachment glycoprotein sequences. *Funct Integr Genomics* 4: 246-257.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.
- Toyoda T, Hamaguchi M, Nagai Y. 1987. Detection of polycistronic transcripts in Newcastle disease virus infected cells and identification of their sequence content. *Arch Virol* 95: 97-110.
- Umali DV, Ito H, Suzuki T, Shirota K, Katoh H and Ito T. 2013. Molecular epidemiology of Newcastle disease virus isolates from vaccinated commercial poultry farms in non-epidemic areas of Japan. *Virology Journal* 10:330. doi:10.1186/1743-422X-10-330
- Yusoff K, Tan WS. 2001. Newcastle disease virus: Macromolecules and opportunities. *Avian Pathol* 30: 439-455.