

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BIOLOGIK VIRUS NEWCASTLE DISEASE

Isolation and Biologic Characterization of Newcastle Disease Virus

Emilia¹, Surachmi Setiyaningsih², dan Retno Damayanti Soejoedono²

¹Program Magister Mayor Mikrobiologi Medik Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor

²Bagian Mikrobiologi Medis Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Laboratorium Virologi
Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

E-mail: emiliahadian@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah memperoleh informasi infeksi dan sifat-sifat biologis virus *Newcastle disease* (ND) pada ayam ras maupun ayam buras. Sejumlah 529 sampel usap kloaka dikoleksi dari pasar-pasar tradisional dan peternakan rakyat di daerah Bogor dan Tangerang. Sebanyak 20 sampel terdeteksi positif melalui *real time reverse transcription-polymerase chain reaction* (RRT-PCR) sedangkan dengan isolasi virus terdeteksi positif sebanyak 11 sampel. Selanjutnya empat isolat representasi lokasi dipilih untuk karakterisasi patogenisitas dengan metode *mean death time* (MDT) pada telur ayam berembrio (TAB) *specific pathogen free* (SPF), dan karakterisasi antigenisitas menggunakan metode *haemagglutination inhibition* (HI) dan virus netralisasi (VN) untuk melihat keragaman antar isolat virus. Uji MDT memperlihatkan dua isolat (kode isolat II dan XIII) adalah mesogenik, satu isolat (kode isolate VIII) termasuk lentogenik, dan satu isolat (kode isolat TW) bersifat *velogenic*. Tiga dari empat isolat menunjukkan hubungan antigenik dengan virus ND *strain* Komarov dan G7 (genotipe 7) tetapi tidak dengan *strain* referensi Lasota, sementara isolat *velogenic* (kode TW) yang berasal dari ayam kampung menunjukkan reaksi silang tinggi dengan antiserum terhadap tiga *strain* referensi di atas. Sampel-sampel yang diambil di lapang baik itu berasal dari pasar dan peternakan rakyat meskipun secara klinis tidak memperlihatkan gejala sakit dapat diisolasi virus ND dengan karakteristik yang beragam.

Kata kunci: *Newcastle disease*, *mean death time* (MDT), *real time reverse transcription-polymerase chain reaction* (RRT-PCR)

ABSTRACT

The purpose of this study was to obtain current situation regarding NDV infection and biological properties in commercial and native chickens. A total of 529 cloacal swab samples were collected from traditional markets and small holder farms in Bogor and Tangerang area. Twenty samples were detected positive by *real time reverse transcription-polymerase chain reaction* (RRT-PCR), and 11 isolates were obtained from virus isolation. Furthermore, four isolates representing each location were selected for pathogenicity characterization using *mean death time* (MDT) method in embryonated SPF egg; antigenicity characterization using HI and virus neutralization (VN) methods to examine variations among virus isolates. Mean death time test showed that 2 isolates (isolate codes II and VII) were mesogenic, one isolate (code VIII) was lentogenic and the other isolate (code TW) was *velogenic*. Three out of four isolates were antigenically related to Komarov and G7 but not to Lasota reference strains, while the *velogenic* isolate (isolate code TW) of native chicken highly related to the three reference strains. Newcastle disease virus with various characteristics could be isolated from samples regardless the origin or clinical status of the poultry.

Key words: *newcastle disease*, *mean death time* (MDT), *real time reverse transcription-polymerase chain reaction* (RRT-PCR)

PENDAHULUAN

Penyakit tetelo atau *Newcastle disease* (ND) merupakan salah satu penyakit unggas yang sangat penting di industri peternakan. Distribusi ND sudah terjadi di seluruh dunia antara lain Asia, Afrika, dan Amerika. Hanya negara-negara Oceania relatif bebas dari penyakit ini, meskipun wabah yang serius pernah terjadi di Australia selama tahun 1998-2000 (Kirkland, 2000). *Newcastle disease* juga merupakan penyakit unggas yang sangat merugikan secara ekonomi karena infeksi yang diakibatkan dapat menyebabkan kematian mencapai 100%. Organisasi Kesehatan Hewan Dunia (OIE) memasukkan penyakit ini dalam kategori *notifiable diseases*, yang pada sistem lama dikategorikan sebagai penyakit "list A".

Newcastle disease disebabkan oleh *strain* virulen dari *avian paramyxovirus type 1* (APMV-1) dari genus *avulavirus subfamily Paramyxovirinae, family Paramyxoviridae*. Virus-virus *paramyxo* yang diisolasi dari spesies unggas sudah diklasifikasi secara serologik dan dianalisis filogenetiknya dalam sepuluh sub tipe yaitu APMV-1 sampai APMV-10. Berdasarkan gejala klinis

yang diperlihatkan ayam terinfeksi virus ND dikelompokkan dalam lima patotipe yaitu *viscerotropic velogenic*, sangat patogenik dengan ciri kematian yang tinggi dan lesi hemoragik pada usus; *neurotropic velogenic*, dengan ciri kematian yang tinggi, gejala pernafasan dan saraf; *mesogenic*, dengan kematian rendah, gejala pernafasan dan saraf; *lentogenic*, dengan gejala klinis ringan dari saluran pernafasan; dan *asymptomatic enteritic*, dengan bentuk infeksi subklinis *enteric* (OIE, 2012).

Wabah ND pertama sekali dilaporkan terjadi di pulau Jawa oleh Kraneveld pada tahun 1926, dan sekarang merupakan penyakit endemik di Indonesia (Moerad, 1987 yang disitasi Adi *et al.*, 2010). Sementara itu, hanya sedikit laporan tentang isolat ND asal Indonesia, seperti virus ND *strain* ITA (Hamid *et al.*, 1991) dan cockatoo/Indonesia/14698/90 (NCBI accession No: AY562985) namun virus-virus tersebut diisolasi hampir 20 tahun yang lalu. Laporan terakhir mengenai isolasi virus ND di Indonesia yaitu tahun 2009, isolat tersebut dinamakan sebagai NDV/Bali-1/07. Virus ND ini tergolong *strain velogenic* yang mempunyai indeks patogenisitas *mean death time* (MDT) 54 jam (Adi *et al.*, 2010).

Vaksinasi terhadap ND sudah diaplikasikan selama beberapa dekade pada industri peternakan. *Strain* vaksin yang terdaftar di Indonesia menurut data Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH) antara lain Lasota, B1, RIVS 2, Clone 30, ITA, Mukteswar, Kimber, Ulster, dan yang terakhir G7 (Genotipe 7) yang merupakan *strain* virus lokal terbaru. Vaksin ND *strain* Lasota mempunyai jumlah terbanyak. Akhir-akhir ini kasus ND masih dilaporkan di lapangan meskipun sudah dilakukan vaksinasi yang ketat pada peternakan ayam. Hal ini kemungkinan disebabkan virus yang bersirkulasi di lapangan tidak sesuai lagi dengan *strain* virus vaksin yang tersedia. Virus ND merupakan virus RNA yang sangat mudah bermutasi. Sa'idu dan Abdu (2008) melaporkan wabah *viscerotropic velogenic newcastle disease* (VVND) pada ayam petelur umur enam minggu yang telah divaksinasi dengan vaksin ND.

Standar referensi untuk mendiagnosis virus ND adalah isolasi virus, meskipun banyak metode lain yang dapat digunakan. Isolasi virus penting untuk mengonfirmasi keberadaan virus dan untuk karakterisasi virus selanjutnya. Telur ayam berembrio (TAB) *specific pathogen free* (SPF) umur 9-11 hari dan *chicken embryo fibroblast* (CEF) sering digunakan untuk isolasi, sedangkan untuk identifikasi virus digunakan uji *haemagglutination* (HA) dan *haemagglutination inhibition* (HI) dengan spesifik antisera (OIE, 2012). Untuk mengidentifikasi patotipe virus ND adalah dengan metode uji MDT yang sudah umum digunakan. Metode ini mengklasifikasi virus berdasarkan waktu rata-rata dalam jam dengan dosis letal minimal yang dapat membunuh embrio ayam. Secara umum penelitian ini bertujuan mendapatkan informasi keberadaan/infeksi NDV pada ayam ras maupun buras. Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi virus ND dengan *real time reverse transcription-polymerase chain reaction* (RRT-PCR), mengisolasi dan mengidentifikasi serta karakterisasi biologik virus ND asal lapangan.

MATERI DAN METODE

Koleksi Sampel

Sebanyak 529 sampel usap kloaka dikoleksi dari 3 lokasi yaitu pasar Serpong, Tangerang (117 sampel), Pasar Modern Bumi Serpong Damai, Tangerang (260 sampel) dan peternakan rakyat di area sekitar Gunungsindur, Kabupaten Bogor (152 sampel). Seluruh sampel ditransportasikan dalam keadaan dingin (4-8° C) sebelum sampai ke laboratorium untuk dilakukan pengujian. Sampel usap disimpan pada kondisi *deep freezer* (-80° C). Tahap selanjutnya sebelum melaksanakan uji RRT-PCR, cairan supernatan yang berasal dari sampel-sampel usap kloaka *dikumpulkan pada satu tabung* berdasarkan asal sampel, waktu pengambilan sampel, dan jenis sampel. Pengumpulan cairan (*pool*) sampel usap kloaka dilakukan pada setiap lima individu. Sisa cairan sampel usap kloaka disimpan kembali dalam *deep freezer* untuk pengujian individu.

Isolasi Ribonucleic Acid (RNA)

Ekstraksi RNA virus ND dilakukan dengan MagMAX™ AI/ND Viral RNA Kit dari Ambion®. Prosedur ekstraksi berdasarkan manual yang diberikan oleh kit tersebut.

Uji RRT-PCR

Urutan *primer/probe* yang dipakai adalah sebagai berikut: matriks *forward* (M+4100) 5'-AGT GAT GTG CTC GGA CCT TC-3'; matriks *reverse* (M+4220) 5'-CCT GAG GAG AGG CAT TTG CTA-3'; dan *probe* M+4169 5'/56FAM/TTC TCT AGC AGT GGG ACA GCC. Protokol yang digunakan untuk uji RRT-PCR sesuai dengan protokol NVSL (2005). Hasil PCR dianalisis menggunakan *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System software*.

Isolasi Virus

Virus yang diisolasi berasal dari sampel usap kloaka yang sudah dikonfirmasi dengan RRT-PCR positif. Isolasi virus dilakukan menurut protokol yang ada di OIE (2012). Konfirmasi virus dilakukan dengan serum ND standar menggunakan uji HA dan uji HI. Selanjutnya, empat isolat dipilih berdasarkan lokasi tempat pengambilan sampel dan dikarakterisasi secara biologik dengan uji MDT untuk melihat patogenisitas isolat virus, kemudian dilakukan propagasi virus di sel CEF untuk melihat sifat virus di kultur jaringan. Isolat virus diuji dengan virus netralisasi.

Propagasi Virus pada Sel CEF

Empat isolat virus terpilih juga dipropagasi pada *primary cell* yaitu CEF. Prosedur yang dilaksanakan sebagai berikut: *monolayer* sel CEF di dalam *flask* 25 cm³ diinokulasi dengan 0,5 ml isolat virus, lalu diinkubasi selama 60 menit di dalam inkubator CO₂ 5%, kemudian ditambahkan *maintenance medium* (MM) ke *flask* yang berisi virus, kemudian diinkubasikan 5% selama 3-5 hari sampai munculnya *cytopathic effect* (CPE). Sebagai kontrol digunakan sel CEF yang tidak diinokulasi virus.

Titrasi Virus pada Telur SPF dan Sel CEF

Virus yang diisolasi kemudian dititrasi pada telur SPF umur 9-10 hari dan sel CEF. Isolat virus diencerkan secara seri (kelipatan sepuluh) dengan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) yang mengandung antibiotik, kemudian diinokulasikan 0,1 ml per telur melalui *chorio allantoic fluid* (CAF). Telur terinfeksi dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 37° C selama 7 hari. Kemudian dihitung titer virus dengan menggunakan rumus *Reed and Muench*. Prosedur titrasi pada sel CEF untuk pengenceran virus sama dengan pengenceran virus pada titrasi virus, tapi tempat inokulasi virus adalah pada sel CEF (<http://www.fao.org/docrep/005/ac802e/ac802e0f.htm>).

Uji HA Cepat pada Plat Makro

Cairan alantoik dan sel darah merah 1% dengan jumlah yang sama dimasukkan ke dalam cawan petri, dicampur merata, ditunggu 30-60 detik dan dilakukan

pengamatan terjadinya aglutinasi sel darah merah (Terregino dan Capua, 2009).

Uji HA dan HI pada Plat Mikro

Protokol untuk uji HA dan HI sesuai dengan prosedur OIE (2012).

Uji Virus Netralisasi

Sampel yang menunjukkan *cytopathic effect* (CPE) diuji dengan menggunakan virus netralisasi metode beta (virus konstan, serum diencerkan. Indeks netralisasi (IN) dihitung berdasarkan metode *Reed and Muench*. Jika $IN > 1,5$ maka isolat dinyatakan signifikan virus ND (Hitchner *et al.*, 1975).

Uji Patogenisitas

Untuk mengidentifikasi isolat virus sebagai virulen atau avirulen salah satu cara adalah berdasarkan pada uji MDT. Metode yang digunakan berdasarkan Adi *et al.* (2010). Uji MDT sudah umum digunakan untuk mengklasifikasi *strain* virus ND dalam kelompok sebagai berikut: *velogenic* (*highly virulent*, MDT<60 jam), *mesogenik* (*moderately virulent*, 60-90 jam), dan *lentogenik* (*avirulent*, MDT>90 jam).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi Virus ND dengan RRT-PCR

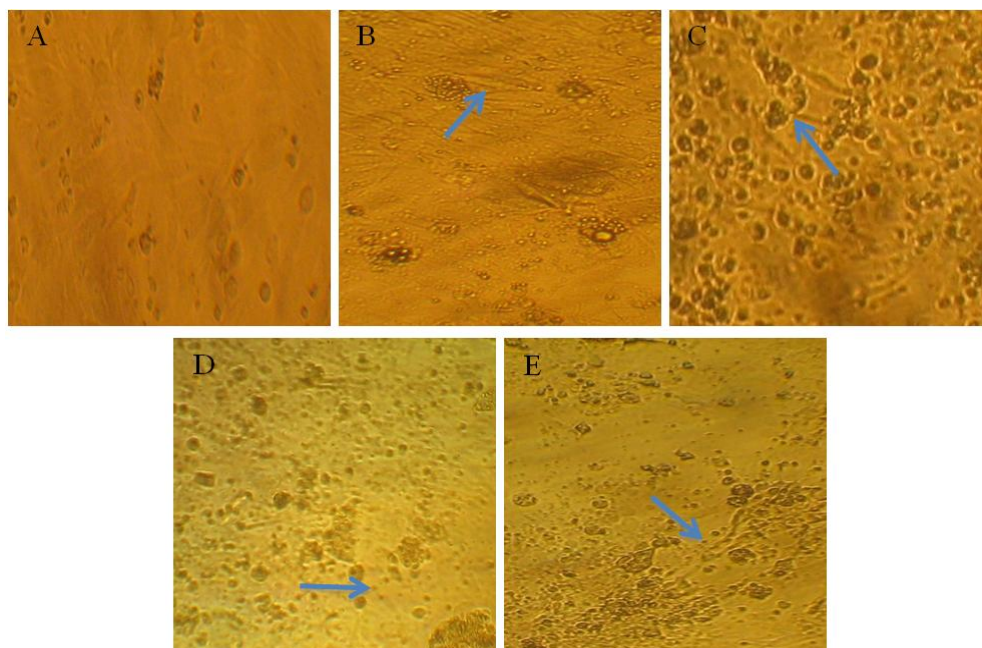
Hasil RRT-PCR dengan primer matriks menunjukkan bahwa sampel dari Pasar Serpong, Pasar Modern Bumi Serpong Damai, dan peternakan rakyat terdeteksi positif virus ND masing-masing sebanyak enam sampel (5,12%), 13 sampel (5%), dan satu sampel (0,65%). Total sampel terdeteksi positif virus ND adalah 20 sampel meskipun sampel usap kloaka yang didapat berasal dari ayam yang tidak

memperlihatkan gejala klinis. Hal yang sama juga didapatkan oleh Solomun *et al.* (2012) yang sudah mengisolasi virus ND dari sampel usap kloaka dan trakea unggas yang secara diagnosis tidak memperlihatkan gejala klinis.

Isolasi Virus pada Telur SPF

Isolasi virus dilakukan terhadap sampel yang positif RRT-PCR terhadap gen matriks. Hasil yang diperoleh memperlihatkan bahwa dari 20 sampel secara uji RRT-PCR terdeteksi positif gen matriks dan ternyata yang berhasil diisolasi serta memperlihatkan uji HA cepat positif sebanyak 11 sampel. Hasil deteksi virus ND dengan RRT-PCR lebih banyak yang positif bila dibandingkan dengan isolasi virus. Hal tersebut disebabkan oleh tingkat sensitivitas uji PCR lebih tinggi bila dibandingkan dengan isolasi virus. Selain itu, isolasi virus memerlukan partikel virus yang hidup untuk dapat tumbuh pada embrio telur, sedangkan dengan PCR hanya diperlukan DNA virus dalam sampel yang diuji. Sampel dengan kode TW berasal dari sampel usap kloaka ayam buras yang secara klinis sakit sehingga sampel tersebut langsung dilakukan isolasi di TAB dan ketika diuji HA memperlihatkan aglutinasi sel darah merah ayam SPF. Hasil konfirmasi dengan uji RRT-PCR menunjukkan hasil positif.

Selanjutnya 11 sampel yang positif uji HA cepat, dipilih empat isolat virus berdasarkan perwakilan lokasi pengambilan sampel. Sampel yang terpilih adalah satu sampel dari Pasar Serpong (kode II), dua sampel dari Pasar Modern Bumi Serpong Damai (kode VIII yang berasal dari ayam pedaging dan kode XIII berasal dari ayam buras), sedangkan dari peternakan rakyat mempunyai kode TW berasal dari ayam buras yang secara klinis sakit.



Gambar 1. CPE pada empat isolat virus dengan dosis infeksi 100 TCID₅₀/0.1 ml 24 jam setelah inokulasi (A. Sel CEF, kontrol negatif; B. CPE isolat II; C. CPE isolat VIII ; D. CPE isolat XIII ; E. CPE isolat TW. Tanda panah biru menunjukkan CPE).

Propagasi Virus pada CEF

Isolat virus II, VIII, XIII, dan TW ternyata menimbulkan *cytopathic effect* (CPE) pada sel CEF dan CPE seperti yang disajikan pada Gambar 1. Sesudah 24 jam infeksi virus, sel CEF secara berangsur-angsur mulai berubah dan timbul CPE. Karakteristik CPE yang terbentuk antara lain *granularity* di dalam sitoplasma, sel terinfeksi menjadi bulat dan mengelompok, membentuk *giant cell*, dan *vakuolization* dalam sel. Hasil ini mirip dengan CPE yang dihasilkan oleh *Vero cell* yang diinfeksi dengan virus ND seperti dilaporkan oleh Ahamed *et al.* (2004). *Vero cell* adalah sel lestari (*cell line*) yang berasal dari sel epitel ginjal *African green monkey*.

Titirasi Virus pada Telur SPF dan Sel CEF

Titer virus yang diperoleh terhadap empat isolat virus disajikan pada Tabel 1. Dari Tabel 1 dapat dilihat titer virus pada telur SPF lebih tinggi dibandingkan titer pada sel CEF kecuali pada isolat II. Ini mengindikasikan isolat-isolat tersebut belum cukup adaptasi pada sel CEF.

Tabel 1. Titer virus pada telur SPF dan sel CEF

No.	Kode virus	Titer virus (per 0.1 ml)	
		Telur SPF	CEF
1.	Isolat II	10 ^{9.5} EID ₅₀ ^a	10 ^{8.0} TCID ₅₀ ^b
2.	Isolat VIII	10 ^{6.5} EID ₅₀ ^a	10 ^{4.5} TCID ₅₀ ^b
3.	Isolat XIII	10 ^{8.0} EID ₅₀ ^a	10 ^{6.7} TCID ₅₀ ^b
4.	Isolat TW	10 ^{7.5} EID ₅₀ ^a	10 ^{6.0} TCID ₅₀ ^b

^aEID₅₀: 50 percent egg infectious dose, ^bTCID₅₀: 50 percent tissue culture infectious dose; SPF= *specific pathogen free*; CEF= *chicken embryo fibroblast*

Perbandingan Hasil Uji *Haemagglutination Inhibition* (HI) dan Uji Virus Netralisasi

Untuk mengetahui homologi antar isolat (isolat II, isolat VIII, isolat XIII, dan isolat TW) dilakukan uji reaksi silang menggunakan uji HI. Uji HI ini menggunakan beberapa antisera positif virus ND yaitu antisera virus ND *strain* Lasota, Komarov, G7, dan ITA terhadap antigen virus ND *strain* Lasota (*lentogenic*), Komarov (*mesogenic*), G7 (*velogenic*), ITA (*velogenic*) dan sebagai kontrol negatif digunakan antisera positif AI. Hasil uji HI terhadap beberapa antisera positif tersebut disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji reaksi silang empat isolat dengan antisera positif virus ND terhadap beberapa *strain* virus standar ND

Antisera	Antigen								
	Las	Kom	G7	ITA	AI	Isolat II	Isolat VIII	Isolat XIII	Isolat TW
Lasota	64	64	16	16	<2	8	8	16	32
Komarov	16	256	64	32	<2	256	256	32	1024
G7	128	256	128	128	<2	256	64	64	128
ITA	128	512	128	128	<2	8	128	128	128
AI (H5)	<2	<2	<2	<2	64	<2	<2	<2	<2

Dari Tabel 2 memperlihatkan hasil uji reaksi silang empat isolat dengan antisera positif virus ND terhadap beberapa antigen standar virus ND menunjukkan bahwa isolat-isolat virus hampir semua memperlihatkan reaksi silang dengan semua antisera

positif virus ND dengan nilai berkisar antara 8-1024. Hal ini membuktikan adanya kesesuaian antara virus satu dengan virus yang lain, sehingga antibodi yang terbentuk dapat menetralkan antigen virus ND. Semua isolat juga menunjukkan reaksi silang yang tinggi terhadap antisera Komarov, G7, dan ITA. Hal ini kemungkinan mengindikasikan bahwa virus lapang tersebut mirip dengan *strain* mesogenik atau *velogenic*. Hasil reaksi silang dari Tabel 2 juga menunjukkan dua isolat mempunyai reaksi silang yang rendah terhadap antisera *strain* Lasota sedangkan dua isolat lainnya masih mempunyai nilai 16-32 yang dipertimbangkan sebagai nilai positif ND (OIE, 2012).

Hasil uji yang diperoleh dengan menggunakan uji virus netralisasi disajikan pada Tabel 3. Hasil yang sama dengan nilai HI juga terlihat pada nilai indeks netralisasi (IN) yang diperoleh pada uji virus netralisasi. Semua isolat menunjukkan nilai IN yang tinggi terhadap antisera Komarov dan G7 sedangkan terhadap antisera Lasota rendah kecuali isolat TW. Ini mengindikasikan isolat TW memiliki kemiripan antigenik yang tinggi terhadap virus rujukan termasuk dengan *strain* Lasota yang merupakan *strain* virus vaksin yang banyak beredar di lapangan. Berdasarkan asal sampel, isolat TW berasal dari ayam buras yang secara klinis sakit dan tidak ada sejarah vaksinasi dengan vaksin ND.

Tabel 3. Nilai indeks netralisasi (IN) empat isolat virus terhadap beberapa antisera positif NDV

Antisera	Antigen							
	Lasota	Komar	G7	AI	Isolat II	Isolat VIII	Isolat XIII	Isolat TW
Lasota	2,1	1,9	0,9	<0,6	0,9	0,9	0,9	2,03
Komarov	1,9	2,7	2,7	<0,6	2,7	2,7	2,7	2,7
G7	2,7	2,7	2,7	<0,6	2,5	1,7	2,175	2,7
AI	<0,6	<0,6	<0,6	2,7	<0,6	<0,6	<0,6	<0,6

Mean Death Time (MDT)

Penilaian virulensi berdasarkan pada berbagai efek letal virus pada embrio ayam pertama sekali digambarkan oleh Hanson dan Brandly (1955). Uji MDT berdasarkan pada pengalaman bahwa virus virulen dapat membunuh embrio lebih cepat daripada virus virulensi rendah. Hasil uji MDT yang dilaksanakan pada penelitian ini menunjukkan patotipe yang diperoleh yaitu *velogenic*, *mesogenic*, dan *lentogenic* (Tabel 4). Semua sampel berasal dari induk semang yang sama yaitu ayam buras kecuali isolat VIII yang berasal dari ayam pedaging. Hasil yang diperoleh untuk isolat VIII menunjukkan patotipe *lentogenic* sedangkan hasil secara antigenik mengarah ke *mesogenic* ataupun *velogenic*.

Tabel 4. Hasil uji patotipe isolat virus *Newcastle Disease*

Kode isolat	Mean death time (jam)	Patotipe	Asal isolat
II	72	Mesogenic	Ayam buras
VIII	144	Lentogenic	Ayam pedaging
XIII	76	Mesogenic	Ayam buras
TW	52	Velogenic	Ayam buras

KESIMPULAN

Sampel-sampel yang diambil di lapang baik itu berasal dari pasar dan peternakan rakyat meskipun secara klinis tidak memperlihatkan gejala sakit dapat diisolasi virus ND dengan karakteristik yang beragam.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis kepada Kepala Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BBPMSOH), pada teman-teman sejawat di unit uji Virologi BBPMSOH, dan bagian Mikrobiologi Medik Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor yang sudah banyak membantu penulis selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Adi, A.A, N.M Astawa, K.S.A. Putra, Y. Hayashi, and Y. Matsumoto. 2010. Isolation and characterization of a pathogenic *newcastle disease* virus from a natural case in Indonesia. **J. Vet. Med. Sci.** 72(3):313-319.

Ahamed, T., K.M. Hossain, M.M. Billah, K.M.D. Islam, M.M. Ahasan, and M.E Islam. 2004. Adaptation of newcastle disease virus (NDV) on vero cell line. **Int. J. Poult. Sci.** 3(2):153-156.

Hamid, H., R.S.F. Campbell, and L. Parede. 1991. Studies of the pathology of velogenic newcastle disease virus infection in non-immune and immune birds. **Avian Pathol.** 20:561-575.

Hanson, R.P. and C.A. Brandy. 1955. Identification of vaccine strains of newcastle disease virus. **Sci.** 122:156-157.

Hitchner, S.B., C. Domermuth, H.G. Purchase, and J.E. Williams. 1975. Isolation and Identification of Avian Pathogen. Arnold Printing Corporation, New York.

Kirkland, P.D. 2000. Virulent newcastle disease in Australia: In through the 'the back door'. **J. Aust. Vet.** 78:331-333.

NVSL. National Veterinary Services Laboratories. 2005. **Real-Time RT-PCR for Detection of Virulent Newcastle Disease Virus in Clinical Samples.** United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service, Ames.

OIE. Office International Des Epizooties. 2012. **OIE Terrestrial Manual. Newcastle Disease.** http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14._ND.pdf.

Sa'idu, L. and P.A. Abdu. 2008. Outbreak of viscerotropic velogenic form of Newcastle disease in vaccinated six weeks old pullets. **Sokoto J. Vet. Sci.** 7(1):37-40.

Solomon, P., B. Shah, M.J. Toni, S. Ismail, and M. Clement. 2012. Phylogenetic analysis of *newcastle disease* viruses isolated from asymptomatic fowls (*Numida melegris*) and Muscovy ducks (*Cairina moscata*) in Nigeria. **J. Trop. An. H. Prod.** 45:53-57.

Terregino, C. and I. Capua. 2009. Conventional Diagnosis of Avian Influenza. In **Avian Influenza and Newcastle Disease.** Capua, I. and D.J. Alexander (Eds.). Springer-Verlag, Italy.