

PATOGENITAS VIRUS *NEWCASTLE DISEASE* PADA AYAM

DYAH AYU HEWAJULI dan N.L.P.I. DHARMAYANTI

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl R.E. Martadinata No. 30, Bogor 16114

(Makalah diterima 14 Februari 2011 – Revisi 7 Mei 2011)

ABSTRAK

Newcastle disease (ND) merupakan salah satu penyakit infeksius yang penting dalam industri perunggasan. ND menyebabkan angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi pada unggas serta kerugian yang sangat signifikan terhadap perekonomian perunggasan. Penyakit ini disebabkan oleh virus *Avian paramyxovirus-1*, termasuk dalam genus *Avulavirus* dan famili *Paramyxoviridae*. Virus ini mempunyai 6 protein utama serta 2 protein *non-structural* yang menyusun genomnya. Protein-protein tersebut adalah *Nucleocapsid protein* (N), *Phosphoprotein* (P), *Matrix protein* (M), *Fusion protein* (F), *Hemagglutinin-neuraminidase protein* (HN) dan *Large polymerase protein* (L) serta 2 protein *non-structural* yaitu protein V dan W dimana 2 protein terakhir tersebut dihasilkan selama proses transkripsi gen P pada proses *editing*. Protein-protein ini mempunyai peran masing-masing dalam menentukan virulensi virus ND. Hasil penelitian yang dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa protein HN dan F mempunyai kontribusi yang sangat signifikan dalam virulensi dan penyebaran virus ND dalam tubuh inang. Virulensi virus ND terutama ditentukan oleh *cleavage site* protein F tetapi hasil penelitian yang dilakukan akhir-akhir ini mengindikasikan bahwa motif *cleavage site* protein F₀ bukan merupakan satu-satunya faktor yang menentukan virulensi virus ND. Selain protein F terdapat protein lain seperti HN dan L yang juga berkontribusi dalam menentukan virulensi virus ND. Virus ND mampu menginfeksi lebih dari 200 spesies unggas, tetapi tingkat keparahan penyakit yang ditimbulkan oleh infeksi virus ND bervariasi, tergantung dari inang (jenis unggas) dan strain virus ND. Ayam mengalami tingkat patogenitas yang paling parah dibandingkan dengan unggas lainnya. Pada umumnya, sistem kekebalan pada ayam dalam melawan infeksi virus ND adalah sama dengan sistem kekebalan yang terdapat pada spesies lainnya. Respon kekebalan seluler dan kekebalan humoral berperan penting dalam melawan infeksi virus ND.

Kata kunci: Newcastle disease, protein, respon kekebalan

ABSTRACT

VIRUS PATHOGENITY OF NEWCASTLE DISEASE IN CHICKEN

Newcastle disease (ND) is one of the highly infectious diseases in poultry industry. Newcastle disease causes high morbidity and mortality in birds, then it causes significant loss for poultry industry. This disease is caused by *Avian paramyxovirus-1*, included in the genus of *Avulavirus* and family of *Paramyxoviridae*. This virus has six prior proteins and two non structural proteins that evolving its genom. Those proteins are *Nucleocapsid protein* (N), *Phosphoprotein* (P), *Matrix protein* (M), *Fusion protein* (F), *Hemagglutinin-neuraminidase protein* (HN) and *Large polymerase protein* (L) and two non structural proteins iVe and W protein which are produced during the transcriptionation process of P gen on editing process. Each of the protein has a specific role that responsible for the virulence of the virus. The previous result showed that HN and F proteins have significant contribution in the virulence and spreading of ND virus in the hosts. Virulence of ND virus primarily is determined by the cleavage site of F protein, but the recent research showed that the cleavage site motif of F₀ protein is not the only factor to determine the virulence of ND virus. Besides F protein, other proteins also contribute patern to the virulence of ND virus. ND virus can infect more than 200 species of birds, but the severity level of the disease varies depending on the host and strain of ND virus. Chicken has the highest pathogenicity index compared to other birds. Generally, the immunity system in chicken against infection of ND virus is similar to the immunity system of other birds. Cell mediated and humoral immunity responses play an important role in overcome ND virus.

Key words: Newcastle disease, protein, immunity response

PENDAHULUAN

Newcastle Disease (ND) merupakan salah satu penyakit infeksius yang penting dalam industri perunggasan. Sejak tahun 1926, ND dilaporkan sebagai penyakit endemis yang terjadi di beberapa negara di dunia. Penyakit ini menyebabkan kerugian yang sangat

signifikan terhadap perekonomian perunggasan. Hal ini dikarenakan angka kesakitan dan angka kematian yang tinggi sampai 100% dari peternakan unggas yang terinfeksi virus ND *strain* virulen sehingga ekspor produk unggas terhambat. Peternakan unggas yang terserang virus ND *strain avirulent* juga berpengaruh

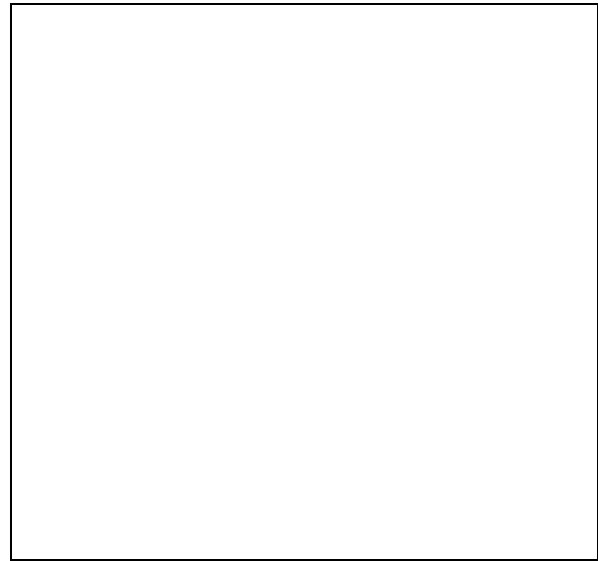
terhadap penurunan produksi unggas (ALDOUS *et al.*, 2003; LEUCK *et al.*, 2004; OJOK dan BROWN, 1996).

Penyakit ND menyebabkan gangguan yang sangat berat pada sistem pernafasan, syaraf dan pencernaan pada ayam. Berdasarkan gejala klinis yang ditimbulkan pada ayam, ND dapat dikelompokkan menjadi 5 patotipe yaitu *viscerotropic velogenic*, *neurotropic velogenic*, *mesogenic*, *lentogenic* dan *asymptomatic enteric*. *Viscerotropic velogenic* merupakan suatu bentuk ND yang sangat patogen dimana lesi pendarahan pada sistem pencernaan sering terlihat pada bentuk ini. *Neurotropic velogenic* adalah bentuk ND yang menyebabkan mortalitas yang tinggi dan biasanya diikuti dengan gangguan sistem respirasi dan syaraf. *Newcastle disease* bentuk *mesogenic* menunjukkan gejala klinis gangguan sistem pernafasan tetapi gangguan sistem syaraf tidak selalu terlihat dan mortalitas yang rendah, sedangkan *asymptomatic enteric* merupakan suatu bentuk infeksi subklinis pada sistem pencernaan (BEARD dan HANSON, 1981). Virus ND *strain avirulent* (lentogenik dan mesogenik) digunakan sebagai vaksin hidup untuk meningkatkan pengendalian penyakit ND pada ayam tetapi pemilihan jenis vaksin tergantung pada kondisi penyakitnya. Vaksin inaktif juga digunakan dalam pengendalian penyakit ND (ALDERS dan SPRADBROW, 2001; OIE, 2008). Patogenitas yang ditimbulkan virus ND dapat ditentukan oleh beberapa faktor diantaranya virulensi virus ND dan inang. Makalah ini mengulas faktor-faktor yang berperan dalam virulensi virus ND dalam menimbulkan patogenitas pada ayam.

SIFAT DAN STRUKTUR VIRUS ND

Virus ND atau *Avian paramyxovirus-1* (Gambar 1) diklasifikasikan dalam golongan genus *Avulavirus* dan famili *Paramyxoviridae* (LAMB *et al.*, 2005). Virus ini berbentuk pleomorfik, sebagian besar berbentuk bulat kasar dengan diameter 100 – 500 nm tetapi juga ditemukan dalam bentuk filamen dengan diameter 100 nm. Panjang virus *paramyxovirus* terlihat bervariasi (YUSSOF dan TAN, 2001). Genom virus ND bersifat *single-stranded* (ss), berpolaritas RNA negatif dengan panjang genom 15,186 nukleotida dan tidak bersegmen. Genom virus ini mempunyai 6 protein utama yang menyusunnya yaitu *Nucleocapsid protein* (N), *Phosphoprotein* (P), *Matrix protein* (M), *Fusion protein* (F), *Hemagglutinin-neuraminidase protein* (HN) dan *Large polymerase protein* (L) (KRISHNAMURTHY dan SAMAL, 1998; DE LEEUW dan PEETERS, 1999). Selama proses transkripsi gen P, terdapat 2 protein *non-structural* yang dihasilkan yaitu V dan W (PEETERS *et al.*, 2004; STEWARD *et al.*, 1993). Protein N, P, HN dan F terletak di bagian luar *envelope* sedangkan protein M terdapat di lapisan dalam virion. Protein-protein ini mempunyai peran masing-masing

dalam menentukan virulensi virus ND (PANDA *et al.*, 2004).



Gambar 1. *Paramyxovirus virion*

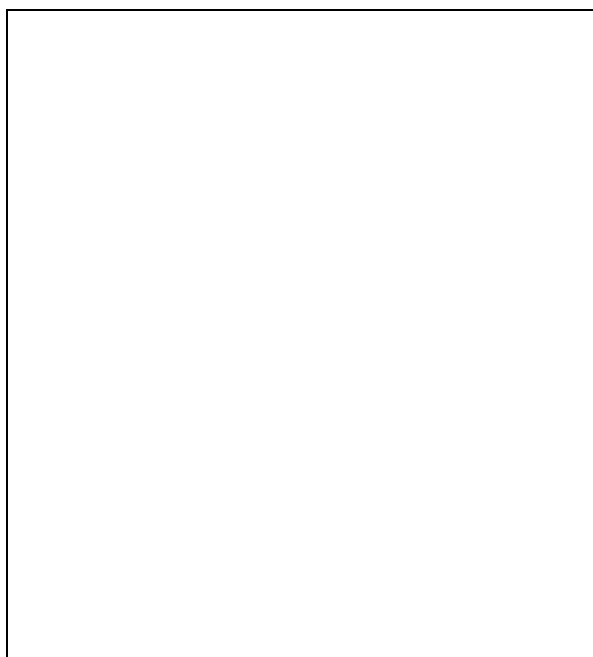
Sumber: ANONYMOUS (2011a)

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa protein HN dan F mempunyai kontribusi yang sangat signifikan dalam virulensi dan penyebaran virus ND dalam tubuh induk semang atau inang (HUANG *et al.*, 2004). Genom virus RNA ND berkaitan dengan protein N, P dan L. Protein N berhubungan dengan virus polimerase (P-L) selama ekspresi genom terjadi serta berhubungan dengan protein P selama pemasangan nukleokapsid. Protein P membentuk senyawa kompleks dengan protein N dan L serta berperan dalam sintesis RNA. Protein L terdapat dalam jumlah paling besar dalam virus ND dan mempunyai aktivitas katalitik yang berhubungan dengan polimerase virus (LAMB dan PARKS, 2007). Selama proses transkripsi gen P terdapat 2 protein *non-structural* yang dihasilkan yaitu protein V dan W (STEWART *et al.*, 1993; PEETERS *et al.*, 2004). Protein V berperan dalam melawan interferon sedangkan protein W fungsinya tidak diketahui (HUANG *et al.*, 2003).

SIKLUS HIDUP DAN MEKANISME INFEKSI VIRUS ND

Protein HN berperan dalam tahap penempelan virus ND pada reseptor sel inang atau induk semang yang mengandung *sialic acid* (NAGAY, 1993). Molekul *sialic acid* ini adalah *glycoprotein* dan *glycolipid*. Penempelan virus dilakukan dengan penyatuan virus dan membran sel yang diperantarai oleh protein F. Virus RNA kemudian dilepaskan dalam sitoplasma dan

terjadi replikasi Gambar 2, (FERREIRA *et al.*, 2004). *Envelope* virus masuk ke dalam sel melalui 2 jalan utama yaitu pertama, penyatuan secara langsung antara *envelope* virus dengan membran plasma dan kedua, diperantarai oleh reseptor endositosis. Penetrasi virus melalui reseptor endositosis tergantung pada kondisi pHnya. Pada *paramyxoviruses*, proses penyatuan membran virus dengan membran plasma inang atau induk semang tidak tergantung pH (SAN ROMAN *et al.*, 1999). Walaupun demikian, hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penyatuan virus ND dengan sel mampu meningkatkan pH. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa penetrasi virus ND pada sel inang melalui reseptor endositosis juga dipengaruhi oleh kondisi pH.



Gambar 2. Skema diagram ilustrasi siklus hidup virus

Sumber: ANONYMOUS (2011b)

Kepekaan sel terhadap virus ND yang tidak virulen dipengaruhi oleh beberapa faktor. Sel tersebut harus mempunyai reseptor yang cocok sehingga virus dapat melakukan penempelan dan masuk ke dalam sel. Disamping itu, sel tersebut juga harus memiliki tripsin yang menyerupai protease dimana enzim ini berperan dalam pemecahan protein F0 menjadi F1 dan F2. Penyebaran reseptor sel pada ayam yang peka terhadap virus ND bentuk tidak virulen bersifat terbatas dan hanya ditemukan pada saluran pencernaan dan saluran pernafasan bagian atas (ALEXANDER, 1991). Sedangkan virus bentuk virulen tidak selalu memerlukan enzim protease dan replikasi virus biasanya terjadi di sebagian besar jaringan induk semang. Replikasi virus yang terjadi di limfosit

menghasilkan suatu respon imun dan produksi antigen virus yang cukup dibutuhkan untuk meningkatkan efektivitas sistem imun. Di dalam saluran pencernaan terdapat faktor-faktor nonspesifik yang mempengaruhi replikasi virus ND. Enzim protease dan pH yang bervariasi mempunyai pengaruh dalam proses penempelan virus pada reseptor sel. Dimana keberadaan tripsin pada beberapa bagian saluran pencernaan dapat mengaktifkan virus ND bentuk tidak virulen setelah virus tersebut dilepaskan dari sel yang kekurangan enzim protease.

Penelitian untuk menentukan tempat awal replikasi virus ND setelah diinfeksi virus V4 secara oral yang dilakukan oleh BOUZARI dan SPARDBROW (2006) menunjukkan hasil bahwa virus dapat diisolasi dari esophagus, tembolok dan trakea setelah 24 jam pascainokulasi virus V4 melalui mulut pada ayam umur 3 minggu. Tetapi jumlah virus yang ditemukan pada organ tersebut lebih sedikit jika dibandingkan dengan organ proventrikulus. Virus V4 juga tidak dapat diisolasi dari organ pencernaan lain dan darah. Meskipun demikian, virus dapat dideteksi pada jejunum, ileum dan caecum pada 6 hari setelah diinfeksi virus V4 melalui tembolok, virus juga dapat ditemukan dalam darah pada 4 hari pascainfeksi. Antigen virus ND dideteksi pada sebagian besar sel epitel saluran pencernaan serta limfosit dan makrofag ditemukan pada lamina propia beberapa jaringan. Hasil penelitian di atas memperlihatkan bahwa tempat awal replikasi virus ND terutama terjadi di saluran pencernaan bagian atas yaitu esophagus, tembolok dan proventrikulus apabila virus ND diinfeksi melalui mulut, sedangkan replikasi virus ND pada saluran pencernaan bagian bawah yaitu duodenum, jejunum, ileum dan caecum kemungkinan terjadi sebagai akibat viremia.

PENENTUAN VIRULENSI VIRUS ND

Virus ND mampu menginfeksi lebih dari 200 spesies unggas tetapi tingkat keparahan penyakit yang ditimbulkan oleh infeksi virus ND bervariasi, tergantung dari induk semang (jenis unggas) dan *strain* virus ND. *Strain* virus ND yang kurang patogen juga dapat menyebabkan penyakit yang parah pada unggas apabila diikuti dengan infeksi sekunder oleh organisme lain dan kondisi lingkungan yang buruk (OIE, 2008). Virus ND dapat dikarakterisasi berdasarkan hasil indek uji patogenitas secara *in vivo* dan atau penentuan secara *molecular multiple basic amino acid* pada *cleavage site* protein F. Virus ND yang mempunyai *intracerebral pathogenicity indices* (ICPI) lebih dari 0,70 pada ayam umur 1 hari dan *intravenous pathogenicity indices* (IVPI) di atas 1,40 pada ayam umur 6 minggu, umumnya mampu menimbulkan penyakit yang parah (OIE, 2008; WISE *et al.*, 2004).

Virulensi virus ND terutama ditentukan oleh *cleavage site* protein F. Kemampuan virus ND untuk berkembang biak dalam sel kemungkinan tergantung pada aktivitas protein H dalam penempelan dan pelepasan virus pada sel dimana penyatuan virus diperantarai oleh protein F (MORISSON, 2003). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *sequence* asam amino F_0 *precursor* virus ND bervariasi dalam menentukan virulensinya. Virus yang bersifat virulen mempunyai motif $^{112}R/K-R-Q-K/R-R^{116}$ pada *C terminus* protein F_2 dan residu *phenylalanine* (F) pada posisi 117 *N terminus* protein F_1 . Motif $^{112}G/E-K/R-Q-G/E-R^{116}$ pada *C terminus* protein F_2 dan residu *leucine* (L) pada posisi 117 (COLLIN *et al.* 1994). Beberapa varian virus pigeon (PPMV-1) mempunyai motif $^{112}G-R-Q-K-R-F^{116}$, tetapi mampu memberikan nilai ICPI tinggi setelah diuji. Virus ND yang virulen terhadap ayam setidaknya terdapat satu pasang residu asam amino pada posisi 116 dan 115 serta residu *phenylalanine* pada posisi 117 dan *basic* asam amino R pada posisi 113 (OIE, 2008).

Perbandingan *sequence* asam amino *cleavage site* protein F dengan *intracerebral pathogenicity indices* (ICPI) terhadap beberapa virus ND yang mempunyai *sequence* asam amino *cleavage site* yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan dalam virulensinya. Virus ND *strain* Hert/33 dengan *cleavage site* protein F $^{112}RRQRRF^{117}$ mempunyai nilai ICPI 1,88 sedangkan *strain* Beaudette C/45 dan Komarov dengan *sequence cleavage site* protein F yang sama dengan *strain* Hert/33 menunjukkan nilai ICPI antara 1,4 dan 1,5 (COLLIN *et al.*, 1993). Virus ND yang bersifat kurang virulen berdasarkan *multiple basic amino acid* yang dimilikinya, tidak selalu bersifat kurang virulen setelah dilakukan uji biologis. Penelitian mengenai karakterisasi secara patotipe dan molekular terhadap isolat-isolat virus ND yang diperoleh dari berbagai macam induk semang atau inang yang berbeda dilakukan Cina, selama tahun 1999 sampai dengan 2005 oleh QIN *et al.* (2007) Mereka memperlihatkan bahwa sebagian besar virus yang mempunyai motif $^{112}R/K-R-Q-K/R-R^{116}$ setelah diuji secara biologis tetap bersifat virulen. Namun demikian terdapat beberapa virus tipe LaSota yang bersifat lentogenik dengan motif $^{112}G-R-Q-G-R-L^{116}$ tetapi setelah diuji secara biologis menjadi bersifat velogenik. Hasil ini mengindikasikan bahwa motif *cleavage site* protein F_0 bukan merupakan satu-satunya faktor yang menentukan virulensi virus ND. Terdapat protein lain yang juga berkontribusi dalam menentukan virulensi virus ND.

Pemetaan faktor-faktor lain yang memiliki peran dalam virulensi virus ND telah dilakukan oleh DE LEEUW *et al.* (2005). Penelitian ini dilakukan dengan membuat *chimeric* virus yang terdiri dari *strain* virus ND yang mempunyai *sequence* asam amino sangat

virulen dan tidak virulen. Suatu infeksi *clone Full Length-Hert* (FL-Hert) yang diperoleh dari *strain* virus Hert/33 yang bersifat sangat virulen digunakan pada penelitian ini dan patogenisitas FL-Hert ditentukan dengan uji ICPI dan IVPI. Penelitian ini juga menggunakan suatu infeksi *clone* dan NDFL (lentogenik) dan NDFLtag (mesogenik) yang berasal dari *strain* virus ND LaSota (PEETERS *et al.*, 1999). Penentuan terdapatnya faktor lain yang juga menentukan virulensi virus ND dilakukan dengan *sequence* NDFL dan NDFLtag diganti dengan *sequence* FL-Hert. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan protein HN pada protein F juga menentukan virulensi virus ND. Peran protein HN dalam virulensi virus ND pada penelitian ini sebagian besar terlihat jelas setelah diuji IVPI. *Stem region* dan *globular head* protein HN juga menentukan virulensi virus ND. Hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh HUANG *et al.* (2004) dengan penukaran gen HN rekombinan *strain* virus Beaudette yang bersifat virulen dan rekombinan *strain* LaSota yang bersifat tidak virulen juga menunjukkan peran protein HN dalam virulensi virus ND.

Peran penting dari 3 residu *conserved* yang diketahui sebagai R416, R498 dan Y526 yang merupakan bagian *binding-site* dari protein HN dalam penentuan patogenitas infeksius virus ND sebelumnya telah dilakukan penelitian oleh CRENNELL *et al.* (2000). Mutasi Y526 menjadi Q atau L mampu menurunkan aktivitas NA dan Had pada *transfected sel* HN cDNA tetapi pengaruhnya terhadap aktivitas fusi tidak diketahui (CONNARIS *et al.*, 2002). Berdasarkan penelitian yang dilakukan KHATTAR *et al.* (2009), hasil memperlihatkan bahwa mutasi yang terjadi pada residu Y526 protein HN virus ND tipe mesogenik *strain* Beaudette C (BC) mampu menurunkan aktivitas neuraminidase, *receptor binding*, dan kemampuan fusi virus pada membran sel serta menurunkan virulensi virus ND pada telur ayam bertunas dan unggas. DE LEEUW *et al.* (2005) menyatakan bahwa dengan uji *haemadsorption* dapat menjelaskan perbedaan peran protein HN dan protein F dalam aktivitas fusi. Uji ini menunjukkan bahwa protein HN virus ND mampu menyebabkan aglutinasi sel darah merah ayam.

Evaluasi peran internal protein (N, P dan L) terhadap virulensi virus ND melalui pendekatan suatu *chimeric reverse-genetic* dilakukan oleh ROUT dan SAMAL (2008). Masing-masing gen N, P dan L secara individu ditukar di antara *strain* virus ND tidak virulen, kurang virulen, LaSota dan Beaudette (BC) selanjutnya gen N, P ditukar secara bersama-sama. *Chimeric* virus dievaluasi patogenitasnya terhadap ayam sebagai inang alami. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa patogenitas *chimeric* virus N dan P sama dengan parental virus. Ini mengindikasikan bahwa gen N dan P kemungkinan berperan kecil terhadap virulensi virus

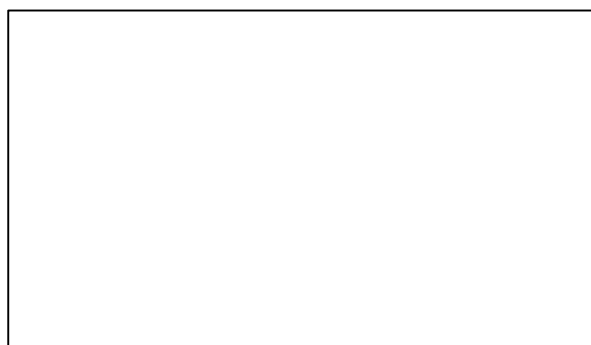
ND. Tetapi penggantian gen L dari virus ND *strain* BC dengan *strain* LaSota signifikan meningkatkan patogenitas L-chimeric virus. Hal ini memperlihatkan bahwa gen L berperan dalam virulensi virus ND. Replikasi L-chimeric virus diketahui 100 kali lebih tinggi dibandingkan dengan parental virus pada otak ayam sehingga peningkatan patogenitas virus ND berhubungan dengan peningkatan replikasi chimeric virus. Penemuan ini memberikan pengetahuan baru dalam patogenitas infeksi virus ND, sehingga saat ini virulensi virus ND tidak hanya mutlak ditentukan oleh peran protein F tetapi interaksi dengan protein-protein lain juga menentukan virulensi virus ND.

VIRULENSI VIRUS ND PADA AYAM DAN UNGGAS LAIN

Newcastle disease virus dapat menginfeksi kalkun tetapi penyakit yang ditimbulkan lebih ringan jika dibandingkan dengan ayam. Patogenitas dari isolat-isolat virus ND yang terdiri dari semua tipe virus ND diuji pada kalkun. Virus ND tipe *lentogenic* tidak menyebabkan gejala klinis yang jelas pada kalkun komersial maupun kalkun *Specific Pathogen Free* (SPF). Gejala klinis depresi terlihat pada kalkun komersial dan SPF yang diinfeksi dengan virus ND tipe *mesogenic*. Replikasi virus ND tipe *mesogenic* biasanya pada mukosa terutama trakea dan esophagus. Myokarditis ditemukan pada kalkun SPF yang diinfeksi virus tipe *mesogenic*. Ini mengindikasikan adanya penyebaran virus ND telah terjadi secara sistemik dan berpotensi menyebabkan penyakit yang lebih parah (PIACENTI *et al.*, 2006). Penelitian yang dilakukan oleh BROWN *et al.* (1999) juga menunjukkan hasil bahwa replikasi virus di myokardium terlihat pada ayam yang terinfeksi virus ND tipe *mesogenic*. Virus ND tipe *neurotropic velogenic* dan *vicerotropic velogenic* yang diinfeksi pada kalkun mampu menimbulkan depresi yang parah dan gangguan syaraf. Tingkat keparahan penyakit yang ditimbulkan kedua *strain* virus di atas terlihat lebih parah pada kalkun SPF dibandingkan dengan kalkun komersial. Patogenitas yang ditimbulkan virus ND juga dipengaruhi oleh dosis virus ND, disamping tergantung dari *strain* virus ND dan spesies induk semang.

Walaupun telah disebutkan bahwa gejala penyakit yang ditimbulkan oleh ND pada kalkun lebih ringan daripada yang terlihat pada ayam, tetapi pemeriksaan histopatologi memperlihatkan hasil yang sama. Hasil uji histopatologi menunjukkan adanya lesi pada jaringan limfoid, intestinal dan syaraf pusat. Gejala klinis pada kalkun biasanya hanya bersifat subklinis dan bersifat *carrier* dalam penyebaran virus ND (PIACENTI *et al.*, 2006). Pada ayam, penyakit ND terlihat lebih patogen dibandingkan pada spesies yang lain seperti kalkun. Beberapa penelitian yang

menunjukkan tingkat patogenitas virus pada ayam telah dilakukan. KOMMERS *et al.* (2002) melakukan pengamatan tentang patogenitas isolat virus *Pigeon Newcastle Disease* yang terdiri dari 4 isolat *Pigeon paramyxovirus* (PPMV-1) dan 2 isolat *Avian paramyxovirus* (APMV-1) terhadap ayam. Pengamatan gejala klinis pada hari ke-2, 4, 5 dan 10 menunjukkan bahwa ayam yang diinfeksi virus PPMV-1 sampai dengan hari ke-14 pascainokulasi tidak terjadi kematian tetapi depresi dan terkulai lemas yang parah sudah terlihat sejak hari ke-10 pascainokulasi. Meskipun kematian tidak terlihat pada ayam yang diinfeksi virus PPMV-1 tetapi lesi yang parah pada otak dapat menyebabkan gangguan syaraf. *Multifocal lymphoplasmacytic* juga ditemukan pada organ jantung, sedangkan ayam yang diinfeksi virus APMV-1 sudah memperlihatkan gejala klinis yang parah pada hari ke-4 pascainokulasi.



Gambar 3. Inklusion bodi eosinofil di intrasitoplasma dan akumulasi granul eosinofil di neuron ayam

Sumber: KOMMERS *et al.* (2002)

Sebagai contoh pada Gambar 3, pengamatan makroskopis pada otak memperlihatkan inklusion bodi eosinofil di intrasitoplasma dan akumulasi granul eosinofil di neuron pada 5 hari pascainfeksi virus ND (APMV-1). Pada pengamatan makroskopi, semua jaringan terjadi kerusakan yang sama sedangkan pengamatan histopatologi ditemukan lesi pada jantung, otak dan limfoid setelah diinfeksi virus PPMV-1 hari ke-5 dan 10. Walaupun demikian, tidak semua isolat PPMV menyebabkan apoptosis sel dan akumulasi fibrin pada limpa (KOMMERS *et al.*, 2002).

Virus ND dapat menyebabkan *apoptosis* pada beberapa jenis sel yang berbeda meliputi *chicken embryo fibroblast* (CEF) dan mononuclear sel darah perifer (LAM dan VASCONCELES, 1994; LAM, 1995). Induksi *apoptosis* sel oleh virus ND secara tidak langsung menggambarkan keterlibatan *apoptosis* dalam patogenitas ND (KOMMERS *et al.*, 2003). Penelitian yang dilakukan RAVINDRA *et al.* (2008) menunjukkan hasil bahwa virus ND mampu menginduksi *apoptosis* sel *chicken embryo fibroblast* (CEF). Protein HN yang

diuji dalam penelitian ini memperlihatkan perannya dalam menyebabkan *apoptosis* sel CEF. Sel yang mengekspresikan protein HN memperlihatkan peningkatan DNA dan vakuola sitoplasma dan adanya *phosphatidylserine*. Regulasi caspase -1,-9,-8,-3 bertambah, potensi mitokondria trans membran menurun serta peningkatan *oxidative* stres juga terlihat pada sel yang terekspresi protein HN. Hal-hal tersebut di atas menggambarkan bahwa protein HN virus ND dapat menyebabkan *apoptosis* sel CEF. *Apoptosis* sel yang terjadi dapat menstimulasi peningkatan replikasi virus ND sehingga mempengaruhi patogenitas ND.

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh KOMMERS *et al.* (2003) telah memberikan laporan awal tentang *apoptosis* sel yang terjadi pada jaringan lymphoid di mana *apoptosis* sel yang terjadi kemungkinan juga diperantarai oleh protein NP. Meskipun demikian, diantara protein-protein virus ND yang ada, interaksi yang terjadi antara protein HN dan F mempunyai peranan yang sangat penting dalam kemampuan infeksi dari virus ND pada sel target dan virulensi virus ND (STONE-HULSLANDER dan MORRISON, 1997). Protein HN dan F apabila berkerja sama mampu menstimulasi terjadinya penempelan dan penyatuan virus ND pada sel-sel lain yang terdapat di sekitar sel yang telah terinfeksi virus ND sebelumnya (MCGINNES dan MORRISON, 2006).

SISTEM KEKEBALAN AYAM DAN UNGGAS LAIN DALAM MELAWAN INFEKSI VIRUS ND

Sistem imun pada unggas dibagi menjadi 2 tipe kekebalan yaitu kekebalan alami dan spesifik (*adaptive immunity*). Kekebalan alami merupakan alat pertahanan pertama terhadap serangan virus. Kekebalan alami meliputi pertahanan fisik dan kimia, protein darah dan sel fagosit. Kulit, mukosa dan sekresi lambung adalah bagian dari pertahanan fisik dan kimia. Komplemen merupakan suatu serum protein yang bekerja bersama dengan antibodi dalam menyampaikan sel target. Beberapa sel darah yang mempunyai fungsi sebagai fagosit di antaranya makrofag, heterofil, trombosit dan *natural killer*. Meskipun kekebalan alami merupakan pertahanan yang berperan pertama kali melawan infeksi suatu virus tetapi kekebalan alami ini kurang spesifik dalam melawan berbagai macam tipe infeksi (ERF, 2004; 2007).

Pertahanan terhadap serangan virus akan digantikan oleh kekebalan spesifik (*adaptive immunity*) apabila kekebalan alami tidak mampu melawan infeksi virus. Kekebalan spesifik mempunyai proteksi yang lebih spesifik terhadap permukaan virus dan biasanya garis pertahanan ini lebih dikenal ketika terjadi infeksi berikutnya. Pertahanan yang bersifat spesifik diperoleh dari kekebalan pasif dan aktif. Kekebalan pasif meliputi antibodi maternal yang telah dimiliki oleh

unggas sebelumnya serta kekebalan ini mampu memberikan perlindungan terhadap infeksi alam atau vaksinasi, sedangkan kekebalan aktif baru muncul melalui infeksi alam atau vaksinasi. Kekebalan aktif dibagi menjadi kekebalan humoral dan kekebalan yang diperantarai sel (ERF, 2004). Limfosit B bertanggung jawab terhadap kekebalan humoral sedangkan limfosit T berperan dalam kekebalan yang diperantarai sel atau *cell-mediated immunity* (CMI). Limfosit B pada ayam ditemukan dalam organ *bursa fabricius* sedangkan limfosit T terdapat pada organ tymus (BARNES, 1996). Timus, *bursa fabricius* dan sumsum tulang merupakan organ lymfoid utama pada unggas sedangkan organ-organ lymfoid pendukung pada unggas adalah limpa, mukosa jaringan lymfoid, kelenjar lymfoid dan susunan syaraf pusat (POPE, 1991).

Sistem kekebalan pada unggas merupakan suatu interaksi yang kompleks antara beberapa tipe sel yang berbeda dan faktor-faktor penting yang mampu meningkatkan efektivitas respon terhadap infeksi patogen (SARKER *et al.*, 2000). Respon kekebalan seluler dan kekebalan humoral berperan penting dalam melawan infeksi virus ND. Respon kekebalan seluler dan humoral timbul setelah 2 sampai dengan 3 hari pascavaksinasi ND tetapi respon kekebalan seluler hanya berperan kecil pada ayam yang divaksinasi ND (BEARD dan BRUGH, 1975; REYNOLDS dan MARAQA, 2000; AL-SHAHERY *et al.*, 2008). Meskipun demikian, penelitian yang dilakukan oleh AL-ZUBEEDY (2009) menunjukkan hasil bahwa selain respon kekebalan humoral, respon kekebalan seluler juga berperan penting dalam meningkatkan kekebalan pada ayam umur satu hari yang divaksinasi ND.

Antibodi merupakan suatu unit yang berfungsi dalam kekebalan humoral. Antibodi dihasilkan oleh sel plasma dari permukaan limfosit B yang mengandung molekul-molekul immunoglobulin (Ig). Antibodi ditemukan dalam cairan tubuh serta efektif dalam melawan infeksi yang terjadi di luar sel (ekstra sel). Terdapat 3 klas atau isotipe immunoglobulin yang ditemukan dalam sistem imun unggas yaitu IgM, IgY(G) dan IgA (LILLEHOJ dan TROUT, 1996). Hasil penelitian yang dilakukan XIAO *et al.* (2009) menunjukkan bahwa program vaksinasi dengan formula vaksin ND yang mengandung 20, 40 dan 80 µg/dosis ekstrak *Momordica chochinensis* mampu meningkatkan titer antibodi IgG pada 14, 21, 28 dan 35 hari pascavaksinasi. Ayam umur 1 hari yang divaksinasi dengan vaksin *live* ND melalui tetes mata mempunyai tingkat kekebalan yang efektif terhadap serangan virus ND dimana *strain* virus vaksin *live* tersebut bereplikasi dengan cepat di membran mukosa konjungtiva, lubang hidung dan *harderian gland* serta mampu menginduksi produksi antibodi IgA (ALEXANDER, 2003; CHANSIRIPORNCHAI dan SASIPREEYAJAN, 2006).

Kekebalan yang diperantarai sel (CMI) efektif melawan infeksi yang terjadi di dalam sel (intra sel). Kekebalan ini bekerja dengan cara menghancurkan sel yang terinfeksi virus atau masuk ke dalam sel untuk menghilangkan antigen virus. Sel limfosit T adalah antigen spesifik dalam respon CMI dan mampu melawan infeksi patogen secara luas. Semua sel T mengekspresikan CD3 kompleks pada permukaan selnya serta terpisah dari reseptor sel T. Sel T *helper* atau yang biasa dikenal dengan CD4 berperan dalam regulasi kekebalan humoral dan CMI. Sel T *helper* berfungsi mengaktifkan makrofag dengan mensekresikan sitokin dan menstimulasi pertumbuhan serta diferensiasi sel B. *Cytotoxic* limfosit T atau yang dikenal dengan CD8 terdapat pada permukaan sel T serta berperan dalam melisiskan sel yang terinfeksi virus atau tumor sel (ERF, 2004).

Sel limfosit T $\alpha\beta$ yang terdapat pada jaringan limfoid perifer ayam menyerupai pada mamalia dan umumnya dapat dibagi menjadi 2 subpopulasi yaitu CD4 dan CD8 (CHAN *et al.*, 1988). Subset Th1 dan Th2 tidak ditemukan pada ayam tetapi reaksi kekebalan dari kedua tipe tersebut dapat diamati. Subset CD8 limfosit T terutama melisiskan sel melalui respon sitokin. Subset CD4 limfosit T dapat menghasilkan beberapa respon sitokin untuk stimulasi antigen (ARSTILA *et al.*, 1994). Apabila salah satu tipe limfosit distimulasi oleh antigen maka proliferasi dan diferensiasi sel limfosit terjadi dalam sel efektor dan sel memori. Sel memori akan kembali muncul ketika antigen yang sama menyerang lagi. Sel ini berdiferensiasi dengan cepat dalam sel efektor untuk melawan antigen. Produksi sel memori yang spesifik terhadap antigen merupakan awal pertahanan terhadap infeksi serta konsep vaksinasi (ERF, 2004; SCOTT, 2004). Respon imun seluler mencapai puncaknya setelah 3 minggu pascavaksinasi virus ND (LIU *et al.*, 2008).

KESIMPULAN

Motif *cleavage site* protein F₀ bukan merupakan satu-satunya faktor yang menentukan virulensi virus ND tetapi terdapat protein-protein lain seperti protein HN dan L yang juga berkontribusi dalam menentukan virulensi virus ND. Tingkat keparahan penyakit yang ditimbulkan oleh infeksi virus ND bervariasi, tergantung dari induk semang (jenis unggas) dan *strain* virus ND. Penelitian yang sudah dilakukan sampai saat ini menunjukkan hasil bahwa ND sangat patogen terhadap ayam. Sistem kekebalan pada unggas merupakan suatu interaksi yang kompleks antara beberapa tipe sel yang berbeda dan faktor-faktor penting yang mampu meningkatkan efektivitas respon terhadap infeksi patogen. Respon kekebalan seluler dan

kekebalan humoral berperan penting dalam melawan infeksi virus ND.

DAFTAR PUSTAKA

- ALDERS, R. and P. SPRADBROW. 2001. Controlling newcastle disease in village chickens. A Field Manual. ACIAR Monograph No. 82. ACIAR, Canberra.
- ALDOUS, E.W., J.K. MYNO, J. BANK and D.J. ALEXANDER. 2003. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus tipe 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol.* 32: 239 – 256.
- ALEXANDER, D.J. 1991. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. *In: Disease of Poultry 9th Ed.* CALNEX, B.W., H.J. BARNES, C.W. BEARD, M.W. REID and H.W. YODER (Eds). Iowa State University Press. Amess. pp. 496 – 519.
- ALEXANDER, D.J. 2003. New castle disease. *In: Disease of Poultry 11th Ed.* SAIF, Y.M. (Ed.). Iowa State University Press. Amess. pp. 64 – 87.
- AL-SHAHERY, M.N., A.Z. AL-ZUBEDY and S.Y. AL-BAROODI. 2008. Evaluation of cell mediated immune response in chickens vaccinated with new castle disease virus. *Iraqi J. Vet. Sci.* 22(1): 21 – 24.
- AL-ZUBEDY, A.Z. 2009. Immune response in day old broiler chick vaccinated against newcastle disease virus. *Iraqi Sci.* 23(2): 143 – 146.
- ANONYMOUS. 2011a. Schematic diagram of paramyxovirus. <http://www2.csdm.qc.ca/iona/lienseducatifs/telechargements/images/Maladies/oreillons/images/paramyxovirus/Paramyxovirustransparent.gif>. (9 Januari 2011).
- ANONYMOUS. 2011b. Virus replication. <http://www.microbiologybytes.com/virology/3035pics/Retro4.gif>. (9 Januari 2011).
- ARSTILA, T.P., O. VAINIO and O. LASSILA. 1994. Central role of CD4⁺ T cells of avian immune response. *Poult. Sci.* 73: 1019 – 1026.
- BARNES, H.J. 1996. Hemic system. *In: Avian Histopathology.* RIDDEL, C. (Ed.). American Association of Avian Pathologists, Kennet Square, PA. pp. 1 – 16.
- BEARD, C.W. and A. BRUGH. 1975. Immunity to Newcastle disease. *Am J. Vet. Res.* pp. 509 – 512.
- BEARD, C.W. and R.P. HANSON. 1981. Newcastle disease. *In: Disease of Poultry.* BARNES, H.J. (Ed.) Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. pp. 452 – 470.
- BOUZARI, M. and P. SPARBROW. 2006. Early events following oral administration of Newcastle disease virus strain V4. *J. Poult. Sci.* 43: 408 – 414.
- BROWN, C., D.J. KING and B.S. SEAL. 1999. Pathogenesis of newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. *Vet. Pathol.* 36: 125 – 132.

- CHAN, M.M., C.L.H. CHEN, L.L. AGER and M.D. COOPER. 1988. Identification of the avian homologue of mammalian CD4 and CD8 antigens. *J. Immunol.* 140: 2133 – 2138.
- CHANSIRIPORNCHAI, J. and J. SASIPREEYAJAN. 2006. Efficacy of live B1 or ulster 2C new castle disease vaccines simultaneously vaccine with inactivated oil adjuvant vaccine for protection of New castle disease virus in broiler chickens. *Acta Vet. Scand.* 48(2): 1 – 4.
- COLLIN, M.S., I. STRONG and D.J. ALEXANDER. 1994. Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed “pigeon PMV-1 viruses.” *Arch. Virol.* 134: 403 – 411.
- COLLIN, M.S., J.B. BASHIRUDDIN and D.J. ALEXANDER. 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.
- CONNARIS, H., T. TAKIMOTO, R. RUSSELL, S. CRENNELL, I. MOUSTAFA, A. PORTNER and G. TAYLOR. 2002. Probing the sialic acid binding site of the hemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus : identification of key amino acids involved in cell binding, catalysis and fusion. *J. Virol.* 76: 1816 – 1824.
- CRENNELL, S., T. TAKIMOTO, A. PORTNER and G. TAYLOR. 2000. Crystal structure of the multi-functional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nat. Struct. Biol.* 7: 1068 – 1074.
- DE LEEUWE, O.S. and B. PEETERS. 1999. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J. Gen. Virol.* 80: 131 – 136.
- DE LEEUWE, O.S., G. KOCH, L. HARTOG, N. RAVERSHORST and B.P.H. PEETERS. 2005. Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the hemagglutinin-neuraminidase protein. *J. Gen. Virol.* 86: 1759 – 1769.
- ERF, G.F. 2004. Cell-mediated immunity in poultry. *Poult. Sci.* 83: 580 – 590.
- ERF, G.F. 2007. Avian immune system. *In: Infectious Bursal Disease and Its Role in Immunosuppression.* Watt Poultry USA webinar.
- FERREIRA, L., E. VILLAR and I. MUNOZ-BARROSO. 2004. Gangliosides and N-glycoproteins function as Newcastle disease virus receptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 2344 – 2356.
- HUANG, Z., A. PANDA, S. ELANKUMARAN, D. GOVINDARAJAN, D.D. ROCKEMAN and S.K. SAMAL. 2004. The Hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. *J. Virol.* 78: 4176 – 4184.
- HUANG, Z., S. KRISHNAMURTHY, A. PANDA and S.K. SAMAL. 2003. Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha of interferon antagonist. *J. Virol.* 77: 8676 – 8685.
- KHATTAR, S.K., Y. YAN, A. PANDA, P.L. COLLIN and S.K. SAMAL. 2009. A Y526Q mutation in the Newcastle disease virus HN protein reduce its functional activities and attenuates virus replication and pathogenicity. *J. Virol.* 83:7779 – 7782.
- KOMMERS, G.D., D.J. KING, B.S. SEAL and C.C. BROWN. 2003. Pathogenesis of chicken-passaged Newcastle disease viruses isolated from chickens and wild and exotic birds. *Avian Dis.* 47: 319 – 329.
- KOMMERS, G.D., D.J. KING, B.S. SEAL, K.P. CARMICHAEL and C.C. BROWN. 2002. Pathogenesis of six pigeon-origin isolates of Newcastle disease virus for domestic chickens. *Vet. Pathol.* 39: 353 – 362.
- KRISHNAMURTHY, S. and S.K. SAMAL. 1998. Nucleotide sequences of the trailer, nucleocapsid protein gene and intergenic regions of Newcastle disease virus strain Beaudette C and completion of the entire genome sequence. *J. Gen. Virol.* 79: 2419 – 2424.
- LAM, K.M. 1995. Apoptosis in chicken embryo fibroblasts caused by newcastle virus. *Vet. Microbiol.* 47: 357 – 363.
- LAM, K.M. and A.C. VASCONCELOS. 1994. New castle disease virus induced apoptosis in chicken peripheral blood lymphocytes. *Vet. Immunopathol.* 44: 45 – 56.
- LAMB, R.A. and G.D. PARKS. 2007. *Paramyxoviridae: The viruses and their replication.* *In: Fields Virology 5th Ed.* KNIPE, D.M. and P.M. HOWLEY (Eds.). Wolters Kluwer-Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. pp. 1449 – 1496.
- LAMB, R.A., P.L. COLLINS, D. KOLAKOSKY, J.A. MELERO, Y. NAGAI, M.B.A. OLDSTONE, C.R. PRINGLE and B.K. RIMA. 2005. Family paramyxoviridae. *In: Virus taxonomy: The Classification and Nomenclature of viruses.* FAUQUET, C.M. (Ed.). The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, CA. pp. 655 – 668.
- LEUCK, D., HALEY, M. and D.U.S. HARVEY. 2004. Livestock and Poultry Trade Influenced by Animal Disease and Trade Restrictions. [http://www.ers.usda.gov/publication/LDP/JUL04/LDPMI2001/\(1 Agustus 2010\).](http://www.ers.usda.gov/publication/LDP/JUL04/LDPMI2001/(1%20Agustus%202010).)
- LILLEHOJ, H.S. and J.S. TROUT. 1996. Avian gut-associate lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* species. *Clin. Micro. Rev.* 9: 349 – 360.
- LIU, R.S., Z.L. XUE, S.B. ZHANG and B.H. WANG. 2008. Adjuvant effect of Chinese retard compound medicine on the immune response to ND vaccination. *Chin. J. Vet. Med.* 44: 27 – 28.
- MCGINNES, L.W. and T.G. MORRISON. 2006. Inhibitor receptor binding stabilizes Newcastle diseases virus HN and F protein containing complexes. *J. Virol.* 80: 2894 – 2903.
- MORRISON, T.G. 2003. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochem. Biophys. Acta* 1614: 73 – 84.

- NAGAY, Y. 1993. Protease-dependent virus tropism and pathogenicity. *Trends Microbiol.* 1: 81 – 87.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). 2008. Newcastle disease. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines. pp. 576 – 589.
- OJOK, L. and C. BROWN. 1996. An immunohistochemical study of the pathogenesis of virulent viscerotropic Newcastle disease in chickens. *J. Comp. Pathol.* 115: 221 – 227.
- PANDA, A., Z. HUANG, S. ELANKUMARAN, D.D. ROCKEMAN and SK. SAMAL. 2004. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microbiol. Pathol.* 36: 1 – 10.
- PEETERS, B., P. VERBRUGGEN, F. NELLISEN and O. DE LEEUW. 2004. The P gene of the Newcastle disease virus does not encode an accessory X protein. *J. Gen. Virol.* 5: 2375 – 2378.
- PEETERS, B.P.H., O.S. DE LEEUW, G. KOCH and A.L. GIELKENS. 1999. Rescue Newcastle disease virus from cloned from cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. Virol.* 73: pp. 5001 – 5009.
- PIACENTI, A.M., D.J. KING, B.S. SEAL, J. ZHANG and C.C. BROWN. 2006. Pathogenesis of Newcastle disease in commercial and specific pathogen-free turkey experimentally infected with isolates of different virulence. *Vet. Pathol.* 43:168 – 178.
- POPE, C.R. 1991. Lymphoid system. *In: Avian Histopathology.* RIDDEL, C. (Ed) American Association of Avian Pathologists, Kennet Square, PA. pp. 18 – 34.
- QIN, Z.M., B.C. MA, X.Y. YUAN, H.Y. YUAN, Y.F. HE and Z.Z. CUI. 2007. Genetic characterization and correlation among fragments of HN gene of the field Newcastle disease viruses. *Bing Due Xue* 23: 39 – 45.
- RAVINDRA, P.V., A. K. TIWARI, B. SHARMA, Y.S. RAJAWAT, B. RATTA, S. PALIA, N.R. SUNDARESAN, U. CHATURVEDI, G.B. ARUNA KUMAR, K. CHINDERA, M. SAXENA, P.K. SUBUNDHI, A. RAI and R.S. CHAUHAN. 2008. HN protein of Newcastle disease virus causes apoptosis in chicken embryo fibroblast cells. *Arch. Virol.* 153: 749 – 754.
- REYNOLDS, D.L. and D.M. MARAQA. 2000. Protective immunity against Newcastle disease : The role of cell mediated immunity. *Avian Dis.* 44: 145 – 154.
- ROUT, S.N. and S.K. SAMAL. 2008. The large polymerase protein is associated with the virulence of Newcastle disease virus. *J. Virol.* 82 : 7828 – 7836.
- SAN ROMAN, K., E. VILLAR and I. MUNOZ-BAROSO. 1999. Acidic pH enhancement of the fusion of Newcastle disease virus with cultured cell. *Virology* 260: 329 – 341.
- SARKER, N., M. TZUDZUK, M. NISHIBORI, H. YASUE and Y. YAMAMOTO. 2000. Cell mediated and humoral immunity and phagocytic ability in chicken lines divergently selected for serum immunoglobulin M and G levels. *Poult. Sci.* 79: 1705 – 1709.
- SCOTT, T.R. 2004. Our current understanding of humoral immunity in poultry. *Poult. Sci.* 83: 574 – 578.
- STEWARD, M., I.B. VIPOND, N.S. MILLAR and P.T. EMMERSON. 1993. RNA editing in Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 74: 2539 – 2547.
- STONE-HULSLANDER, J. and T.G. MORRISON. 1997. Detection of an interaction between the HN and F proteins in Newcastle virus infected cells. *J. Virol.* 71: 6287 – 6295.
- WISE, M.G., H.S. SELLERS, R. ALVAREZ and B.S. SEAL. 2004. RNA-dependent RNA polymerase gene analysis of worldwide Newcastle disease virus isolates representing different virulence and their phylogenetic relationship with other members of the Paramyxoviridae. *Virus Res.* 104: 71 – 80.
- XIAO, C, G. BAO and S. HU. 2009. Enhancement of immune responses to Newcastle disease vaccine by supplement of extract of *momordica choichinchinensis* (Lour) spreng seeds. *Poult. Sci.* 88 : 2293 – 2297.
- YUSSOF, K. and W.S. TAN. 2001. Newcastle disease virus: Macromolecules and opportunities. *Avian Pathol.* 30: 439 – 455.