

## Karakterisasi Virus Newcastle Disease yang Diisolasi dari Burung Merak di Kota Palembang Sumatera Selatan

### *Characterization of Newcastle Disease Virus Isolated from Peacocks in Palembang City, South Sumatra*

Liza Angeliya<sup>1,\*</sup>, Akbar Agus Anshori Mussama<sup>5</sup>, Syarifah Alawiyah<sup>4</sup>, Triguntoro<sup>4</sup>, Eko Agus Srihanto<sup>4</sup>, Yuli Purwandari Kristianingrum<sup>2</sup>, Widya Asmara<sup>3</sup>, Michael Haryadi Wibowo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Doktor Sain Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>2</sup>Departemen Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>3</sup>Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>4</sup>Balai Veteriner Lampung, Bandar Lampung

<sup>5</sup>Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Lampung, Bandar Lampung

\*Email: [liza\\_angeliya@yahoo.com](mailto:liza_angeliya@yahoo.com)

Diterima : 13 Juli 2022, direvisi : 7 Februari 2023, disetujui : 20 Februari 2023

#### Abstract

Introduction: Newcastle Disease (ND) is an infectious disease in various types of poultry caused by the Newcastle Disease Virus (NDV). Cases of ND in Indonesia have been reported in commercial and backyard chickens, pigeons, ducks and geese, even in eagles and peacocks. Peacock is a wild bird protected by Indonesia's Government Regulation No. 7 of 1999. This study aims to identify, isolate and characterize the NDV molecularly in cases diagnosed as ND in peacocks. Method: Samples were obtained from organs (lungs and spleen) of peacocks which showed neurological symptoms, diarrhoea and then died. Real-time RT-PCR ND was used to identify the cause of death of the peacock. Virus isolation and observation of embryonic changes and death were carried out on embryonic chicken eggs. Sequencing was carried out to characterize the F and HN entire genes of the NDV. The nucleotide sequences were analyzed using MEGA-X software, including amino acid prediction, analysis of genetic variation at the amino acid level, homology and construction of the phylogenetic tree. Result: The results of the sample identification were positive for the Newcastle disease virus. Observations of chicken embryos are stunted, have few feathers, are haemorrhagic, and die in less than 60 hours. Virus isolation was obtained with a titer of  $2^6$ . Molecular analysis showed that the RRQKRF cleavage site pattern in the F gene had homology of 95.8-97.6% and was in the same branching area as the previous ND virus in Indonesia. There were no amino acid mutations at the antigenic site, glycolysis and neutralization epitopes in the HN gene. Conclusion: The virus isolated from the peacock is a velogenic strain of NDV, subgenotype VII.2 and has a close genetic range to the NDV that has been previously reported in commercial and domestic poultry. This result shows that ND is also a threat to protected wild birds. Suggestion: Further studies need to be carried out regarding the distribution of the NDV in wild and captive birds, which can become a reference for controlling ND in captive wild birds that can potentially transmit the NDV to commercial chickens.

| Newcastle Disease virus| F gene| HN gene| pathogenicity| genotype| peacock

#### Abstrak

Latar belakang: *Newcastle Disease* (ND) merupakan penyakit infeksius pada berbagai jenis unggas yang disebabkan oleh virus ND dari keluarga *Paramyxoviridae*. Kasus ND di Indonesia telah dilaporkan pada ayam komersial, buras, merpati, bebek, dan angsa, bahkan pada burung elang dan merak. Burung merak merupakan satwa yang dilindungi berdasarkan PP No. 7 Tahun 1999. Studi ini bertujuan untuk identifikasi, isolasi dan karakterisasi virus ND secara molekuler pada kasus yang terdiagnosis sebagai penyakit ND pada burung

merak. Metode: Sampel diperoleh dari gerusan organ (paru-paru dan limpa) burung merak yang menunjukkan gejala syaraf, diare kemudian mati. *Real-time* RT-PCR ND digunakan dalam identifikasi penyebab kematian burung merak tersebut. Isolasi virus serta pengamatan terhadap perubahan dan kematian embrio dilakukan pada telur ayam bertunas. Sekuensing dilakukan untuk karakterisasi molekuler gen utuh F dan HN virus ND. Sekuen nukleotida yang diperoleh dianalisis dengan *software* MEGA-X meliputi prediksi asam amino, analisa variasi genetik pada tingkat asam amino, homologi dan konstruksi pohon kekerabatan. Hasil: Hasil identifikasi sampel tersebut adalah positif virus ND. Pengamatan embrio ayam mengalami kerdil, sedikit bulu, perdarahan, dan mati dalam waktu kurang dari 60 jam. Isolasi virus diperoleh dengan titer  $2^6$ . Analisa molekuler menunjukkan pola *cleavage site* RRQKRF pada gen F, memiliki homologi 95,8-97,6% dan berada pada percabangan yang sama dengan virus ND di Indonesia sebelumnya. Tidak terjadi mutasi asam amino pada tapak antigenik, glikosilasi, dan epitop netralisasi pada gen HN. Simpulan: Virus yang diisolasi dari burung Merak merupakan virus ND strain velogenik, subgenotipe VII.2 dan memiliki jarak genetik yang dekat dengan virus ND yang pernah dilaporkan sebelumnya pada unggas komersial maupun buras. Hal ini menjadi bukti bahwa penyakit ND juga menjadi ancaman terhadap burung yang dilindungi. Saran: Studi lebih lanjut perlu dilakukan, mengenai sebaran penyakit ND pada burung liar di alam maupun yang dikandangkan sehingga dapat menjadi acuan pengendalian penyakit ND pada burung liar yang dilindungi yang berpotensi dalam transmisi virus ND pada ayam komersial.

| Virus Newcastle Disease| gen F | gen HN| patogenesis| genotipe| burung merak

## Pendahuluan

*Newcastle disease* disebabkan oleh virus dari famili Paramyxoviridae, genus *Avulavirus*, spesies *Avian paramyxovirus* serogrup *Avian paramyxovirus* Tipe I (APMV-I), yang saat ini telah diklasifikasikan ke famili Paramyxoviridae, subfamili Avulavirinae, genus *Orthoavulavirus*, spesies *Avian orthoavulavirus* 1 (AOA-1) atau *Newcastle disease virus* (NDV) (Amarasinghe et al., 2018; ICTV, 2020). Virus ini termasuk kelompok *single strand* RNA, beramplop, tidak bersegmennan dan polarisasi negatif. Replikasi virus terjadi di sitoplasma. *Avian paramyxovirus* Tipe I (APMV-I) adalah merupakan sinonim dari virus ND yang memiliki genotip yang bervariasi (Alexander and Senne, 2008). APMV-I dapat menginfeksi berbagai unggas domestik seperti ayam, kalkun, angsa, bebek, burung merpati, burung unta, kakaktua, nuri, beo dapat terinfeksi virus ND (Ellakany et al., 2019).

NDV yang bersirkulasi pada ayam komersial baik layer maupun broiler di Indonesia adalah genotipe VII (Goraichuk et al., 2020; Wibowo et al., 2017, Angeliya et al., 2015). Kasus ND telah dilaporkan pada bebek yang disebabkan oleh NDV genotipe II, VI, dan VII (Putri et al., 2021), pada angsa (Putri et al., 2019) adalah NDV lentogenik dengan yang pola *cleavage site* mirip dengan ND LaSota dari genotipe II. Elang Brontok yang menunjukkan gejala klinis penyakit ND telah dilaporkan di Jawa Barat

(Anonim, 2019). Kasus ND juga dilaporkan pada burung merak di Sumatera selatan (Anonim, 2022). Burung merak termasuk satwa liar yang dilindungi undang-undang, sebagaimana tertuang dalam Lampiran PP No. 7 Tahun 1999. Keberadaan burung liar dapat menjadi perantara mekanik penularan virus ND pada ayam komersial. Burung liar dapat menjadi resevoir penyebaran virus ND. Burung liar kemungkinan kontak dengan lingkungan yang tercemar virus ND dari ayam yang terinfeksi ND (Garcia et al., 2013).

Gen F digunakan sebagai penentu patogenesis molekuler virus ND. *Cleavage site* pada gen F adalah daerah yang dapat menentukan patogenesis molekuler dari virus ND (Alexander and Senne, 2008; Jindal et al., 2009). Gen lain pada virus ND seperti gen P, M, HN dan L (Wise et al., 2004) dapat digunakan dalam identifikasi penyakit ND secara molekuler akan tetapi standar dalam identifikasi pathogenesis virus ND adalah pada gen F yang meliputi *cleavage site* (OIE, 2012).

Protein HN juga terlibat dalam klasifikasi virulensi virus. Protein tersebut bertanggung jawab pada pengenalan dan absorpsi dari virus pada asam sialat yang terdapat pada reseptor permukaan sel (Iorio et al., 2001). Protein HN dan F berinteraksi satu sama lain berperan dalam tingkat infeksi dan virulensi virus (Stone-Huslander and Morisson TG, 1997).

Karakterisasi molekuler virus ND gen HN dan F pernah dilakukan pada beberapa isolat asal ayam namun pada isolat asal burung merak belum pernah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis karakter virus ND yang diisolasi dari Burung merak secara molekuler meliputi patogenesis, variasi genetik, homologi, dan hubungan kekerabatan antar virus ND di Indonesia. Informasi tersebut diharapkan dapat sebagai acuan pengendalian penyakit ND pada burung liar yang dilindungi dan diadaptasi sebagai peliharaan dimana dapat berpotensi dalam transmisi virus ND pada ayam komersial.

## Materi dan Metode

### Identifikasi penyebab kematian burung Merak dengan Real time RT-PCR ND

*Realtime* RT-PCR dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Balai Veteriner Lampung. Reagen untuk amplifikasi *deoxyribonucleic acid* (DNA) dimasukkan ke dalam mikrotube ukuran 0,2 mL. Reagen tersebut terdiri dari AgPath-ID™ One-step RT-PCR Kit Cat.no. AM1005, sepasang primer spesifik *forward*, *reverse*, *probe*, NFW dan RNA hasil ekstraksi.

Kit ekstraksi RNA yang digunakan adalah *Purelink Viral RNA/DNA minikit*. Prosedur disesuaikan dengan petunjuk pabrik (Invitrogen). Organ dan swab kloaka yang telah dibuat suspensi sebanyak 200 µL ditambah dengan 200 µL *lysis buffer*, 25 µL *Proteinase K* dan 5,6 µL *carrier* RNA kemudian dicampurkan di dalam tube 1,5 mL. Suspensi tersebut divortex dan diinkubasikan pada suhu 56°C selama 15 menit dalam *waterbath*. Sebanyak 250 µL *alcohol absolute* ditambahkan dalam suspensi, kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama 5 menit. *Spin column* digunakan untuk menampung suspensi yang akan disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4-8°C selama 1 menit. *Collection tube* diganti dan ditambahkan 500 µL *Wash Buffer I* pada *spin column* kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4-8°C selama 1 menit. Cairan pada *collection tube* dibuang. Sebanyak 500 µL *Wash Buffer II* ditambahkan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4-8°C selama 1 menit. *Collection*

*tube* diganti dan *Spin column* disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4-8°C selama 1 menit untuk pengeringan. *Collection tube* diganti dengan *recovery tube*, ditambahkan 50 µL *nuclease free water* (NFW), diinkubasikan pada suhu ruang selama 1 menit kemudian disentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4-8°C selama 1 menit. *Spin column* dibuang dan tube yang berisi *Ribonucleic acid* (RNA) diberi label. RNA yang diperoleh digunakan sebagai *template* dalam amplifikasi.

Larutan campuran reagen dengan RNA tersebut diamplifikasi dengan menggunakan mesin ABI 7500 *Real time PCR Thermo Cycler*. Volume total dari *reaction mix* dalam tube PCR adalah 25 µL yang terdiri atas 12,5 µL *2x RT-PCR Buffer mix*, 1 µL *25 x RT-PCR Enzyme Mix*, primer *forward*, primer *reverse* masing-masing 1 µL dengan konsentrasi 20 pmol dan *probe* 1 µL dengan konsentrasi 5 pmol, NFW 5,5 µL dan 2,5 µL *template* RNA hasil ekstraksi. Program amplifikasi pada mesin ABI 7500 *Real time PCR Thermo Cycler* sebagai berikut: RT (suhu 45°C selama 10 menit) sebanyak 1 siklus; *pre denaturasi* (suhu 95°C selama 10 menit) sebanyak 1 siklus; *denaturasi* (suhu 95°C selama 15 detik), *annealing* (suhu 60°C selama 45 detik). Hasil terlihat pada layar monitor berupa kurva dan angka *ct value*. *Ct value* < 40 adalah positif, *Ct value* 40-45 adalah *indeterminate* dan *Ct value* > 45 atau *Undet* adalah negatif.

### Isolasi Virus Newcastle disease (ND) dari gerusan organ burung merak.

Sampel organ (paru-paru dan limpa) seberat 1 gram diletakkan pada mortal steril. Organ tersebut digerus sampel dan dihomogenkan dengan 10 ml larutan PBS yang berisi antibiotik (peniciline =250 unit dan streptomysin 50 ug/ml). Larutan disentrifuse pada 2500 g selama 5 menit. Supernatan diambil dan disimpan pada mikrotube steril. Supernatan tersebut digunakan untuk isolasi virus pada telur ayam bertunas. Gerusan organ berupa supernatan dan kontrol negatif 0,2 ml diinokulasikan pada telur ayam berembrio umur 10 hari. Telur yang telah diinokulasi dimasukkan ke dalam Inkubator 37°C selama lima hari. Kematian embrio diamati setiap 24 jam. Embrio yang mati dan yang masih hidup setelah TAB diinkubasi selama 5

hari, kemudian disimpan pada suhu 4°C selama 4 jam atau semalam untuk dipanen. Cairan allantois hasil panen dilakukan uji hemaglutinasi dengan sel darah merah 10% untuk mengetahui ada nya virus yang mempunyai sifat menghemaglutinasi sel darah merah. Isolat Positif virus yang mampu menghemaglutinasi sel darah merah harus dilakukan identifikasi virus. Metode isolasi virus ND mengacu pada metode yang digunakan di Balai Veteriner Lampung.

### Uji Hemaglutinasi (HA) Newcastle disease

Uji HA dilakukan dengan diluen PBS<sup>(-)</sup> sebanyak 25 ul pada semua lubang dengan menggunakan multichannel pipet sebanyak 3 kolom. Tambahkan antigen/Isolat sebanyak 25 ul pada lubang no.1, lanjutkan dengan melakukan pengenceran seri kelipatan 2 mulai lubang no.1 sampai dengan lubang no. 11 dengan multichannel pipet; Lakukan juga untuk pengenceran 1/3; 1/4; 1/5. Tambahkan PBS<sup>(-)</sup> sebanyak 25 ul pada semua lubang. Tambahkan sel darah merah ayam 1% pada semua lubang sebanyak 25 ul. Tiap pencampuran dengan mikromikser selama 10 detik. Eramkan pada suhu kamar selama 40 menit. Pembacaan hasil dengan melihat adanya reaksi Hemaglutinasi sempurna, dengan indikator ada atau tidak ada tetesan air mata (dengan memiringkan mikroplate). Pengenceran tertinggi yang memperlihatkan reaksi Hemaglutinasi optimal disebut sebagai 1 HAU.

### Amplifikasi gen F dan HN dan sekuensing gen F dan HN

Hasil pemeriksaan sampel yang menunjukkan positif ND berdasarkan uji RT-PCR *real time*, kemudian dilanjutkan dengan *reverse transcriptase Polymerase Chains Reaction* (RT-PCR). Proses amplifikasi masing-masing dilakukan dengan RT-PCR menggunakan primer *forward* dan *reverse* untuk mengamplifikasi sekuen nukleotida gen F dan HN. Dua set primer yang terdiri dari 3 pasang primer *over laping* (*forward* dan *reverse*) mengamplifikasi pada gen F sepanjang 1668 basa nukleotida dan 3 pasang primer *over laping* (*forward* dan *reverse*) mengamplifikasi 1715 basa nukleotida yang dilanjutkan sekuensing sebagai karakterisasi gen F utuh dan HN utuh. Masing-masing pasang

primer dilakukan hal yang sama sebagai berikut: Reagen untuk amplifikasi *deoxyribonucleic acid* (DNA) dimasukkan ke dalam mikrotube ukuran 0,2 mL. Reagen tersebut terdiri dari 2x *reaction mix*, *superscript III platinum taq hi fi*, sepasang primer spesifik *forward* dan *reverse*, NFW dan RNA hasil ekstraksi. Larutan tersebut diamplifikasi dengan menggunakan mesin *Thermocycler*. Hasil amplifikasi dikirim sekuens ke laboratorium *1<sup>st</sup> Base* di Malaysia. Hasil sekuens berupa Abi-file dianalisis menggunakan *software* bioinformatika (Program Mega-X), untuk menentukan patogenesisitas, variasi genetik, jarak genetik dan genotipe virus ND yang diisolasi dari burung merak yang menunjukkan gejala syaraf dan diare.

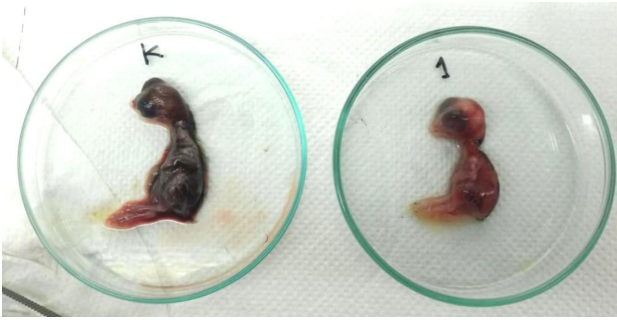
### Analisis Genetik, Pathogenesisitas dan Hubungan kekerabatan Virus ND

Hasil sekuens berupa Abi-file dianalisis menggunakan *software* bioinformatika untuk menentukan patogenesisitas, variasi genetik, homologi dan jarak genetik serta genotipe virus ND yang diisolasi dari burung merak yang menunjukkan gejala syaraf dan diare hingga mati. Konstruksi pohon kekerabatan dari data set menggunakan metode Neighbour-Joining dalam MEGA-X (Kumar *et al.*, 2018). Pohon digambar menurut skala, dengan panjang cabang dalam satuan yang sama dengan jarak evolusioner yang digunakan untuk menyimpulkan pohon filogenetik. Jarak evolusioner dihitung menggunakan metode Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004)

### Hasil dan Pembahasan

Hasil pengujian menggunakan *Real time* RT-PCR dari sampel asal burung merak adalah positif ND dengan hasil ct value 19.23. Virus dapat diisolasi dengan menghasilkan titer 2<sup>6</sup>. Metode *real-time* PCR yang menargetkan gen Matriks (M) hanya digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan RNA dari APMV-1. Diferensiasi antara strain velogenic, mesogenic, dan lentogenic tidak dapat dilakukan pada gen M (Cattoli *et al.*, 2011).

Patogenesisitas virus ND dapat diamati dari rerata lamanya waktu kematian embrio paska inokulasi yaitu Mean Death Time (MDT). Pengamatan embrio pada hasil isolasi virus



Gambar 1. Perubahan patologi embrio ayam dari TAB yang diinfeksi dengan virus ND. (K) embrio dari TAB yang diinfeksi dengan PBS sebagai kontrol negatif. (1) embrio dari TAB yang diinfeksi dengan virus ND dari burung merak.

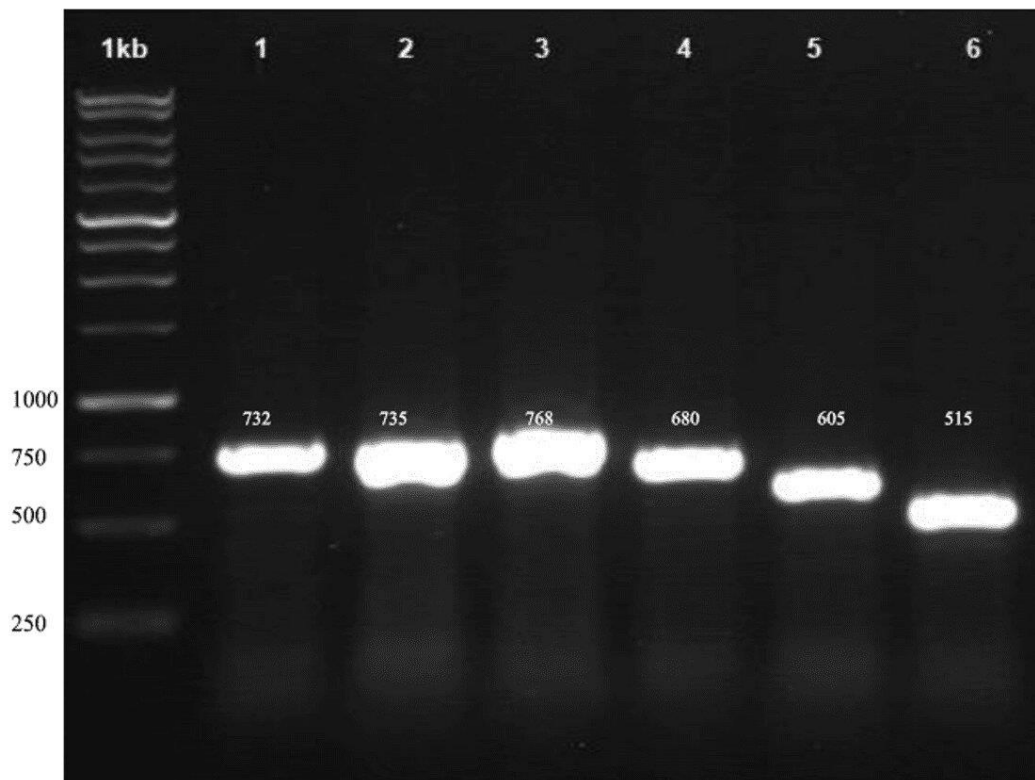
tersebut adalah terjadi kekerdilan, pertumbuhan bulu lebih sedikit dan perdarahan serta mati dalam waktu kurang dari 60 jam (Gambar 1). Virus ND yang menyebabkan kematian embrio kurang dari 60 jam adalah merupakan strain velogenik (OIE, 2012).

Hasil amplifikasi virus pada gen F dan HN terlihat adanya pita DNA pada target sesuai dengan primer masing-masing. Posisi pita DNA terlihat pada Gambar 2. Produk PCR tersebut dilanjutkan ke proses sekuensing dan diperoleh sekuen nukleotida berupa file ABI. Basa nukleotida yang diperoleh diurutkan dan disambung menjadi satu gen utuh menggunakan

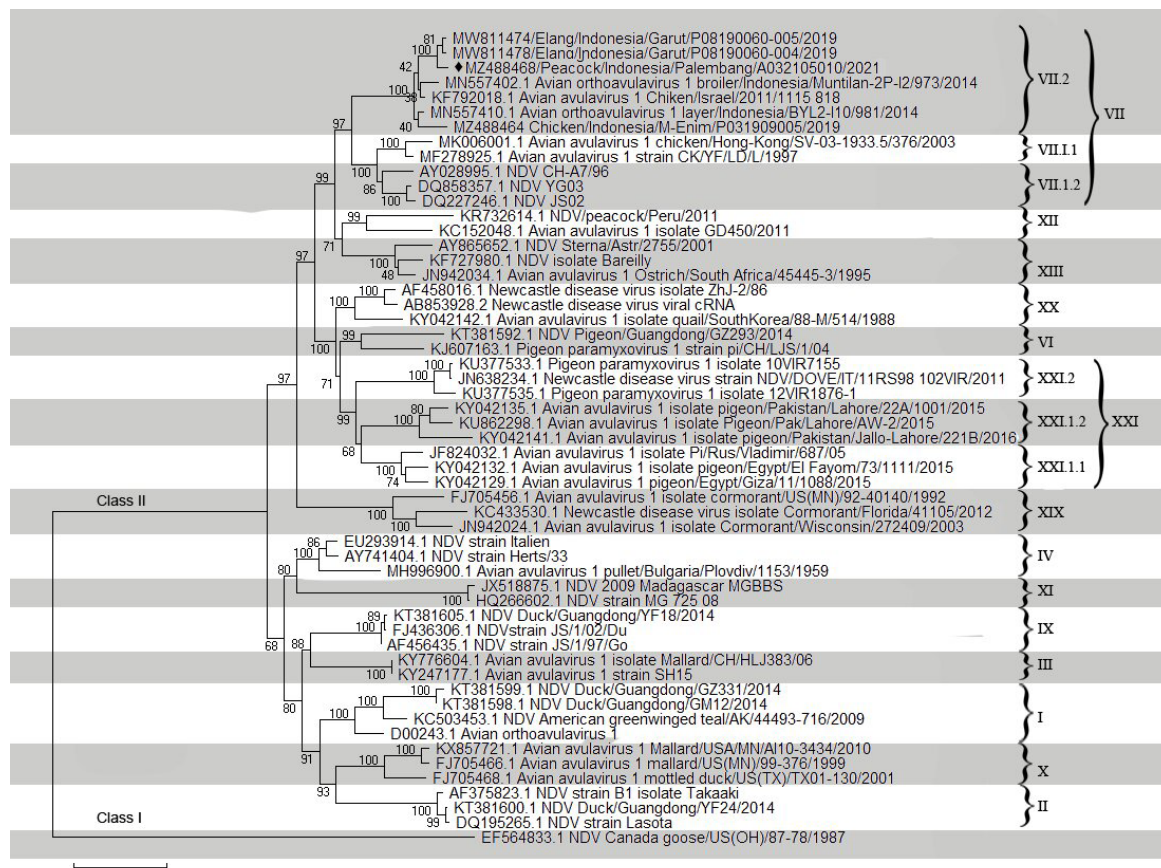
Mega-X. Sekuen dari gen tersebut telah diajukan dan tersedia di GenBank dengan nomer akses MZ488468 untuk gen F dan MZ488477 pada gen HN.

Banyak varian unggas peliharaan yang telah dilaporkan terinfeksi virus ND diantaranya angsa, bebek, kalkun, elang, dan burung kakak tua (Ellakany *et al.*, 2019; Kommers *et al.*, 2002). Burung peliharaan maupun liar dapat menjadi perantara mekanik dalam penularan penyakit ND pada ayam komersial (Garcia *et al.*, 2013). Hasil analisa konstruksi pohon kekerabatan pada studi ini merupakan laporan pertama mengenai virus ND yang diisolasi dari burung merak di Indonesia adalah tergolong dalam genotipe VII subgenotipe VII.2 (Gambar 3). Virus ND genotipe VII telah dilaporkan bersirkulasi di Indonesia, baik pada ayam komersial, buras maupun unggas lainnya seperti bebek, dan burung (Goraichuk *et al.*, 2020; Putri *et al.*, 2021; Wibowo *et al.*, 2017). Strain Lentogenik dari NDV dapat diisolasi dari angsa dan bebek (Putri *et al.*, 2019).

Gen F pada virus ND memiliki 12 residu sistein yang lestari pada asam amino ke 25, 76, 199, 338, 347, 362, 370, 394, 399, 401, 424, and 523 (Qin *et al.*, 2008). hasil analisa pada



Gambar 2. Pita DNA hasil amplifikasi RT-PCR masing-masing primer. Produk PCR dari hasil amplifikasi masing-masing primer: F1 (1), F2 (2), F3 (3), HN1 (4), HN2 (5), dan HN3 (6).



Gambar 3. Konstruksi pohon kekerabatan berdasarkan urutan nukleotida dengan panjang penuh ( $n = 1662$ ) dari gen fusi dari isolat terpilih yang mewakili subgenotipe NDV kelas II ( $n = 54$ ) dan kelas I sebagai kelompok luar ( $n = 1$ ). Konstruksi pohon dibuat dengan metode Neighbor-Joining dengan pengulangan uji *bootstrap* (1000) menggunakan software MEGA-X. Isolat dalam penelitian ini ditandai dengan wajik hitam (♦)

isolat burung merak menunjukkan tidak terjadi variasi pada asam amino tersebut. Asam amino pada epitop netralisasi dari virus ND tersebut juga lestari (Tabel 1). Epitope netralisasi yang berperan dalam merangsang pembentukan antibodi yang dapat menetralkan virus tersebut pada lokasi 72, 74, 75, 78, 79, 151-171, and 343 (Munir *et al.*, 2012).

Virus ND dalam studi ini dengan tanda wajik hitam memiliki pola yang sama dengan virus ND Indonesia yang diisolasi dari kakaktua (AY562985) tahun 1990 (*unpublished*), ayam buras dari Muara Enim (MZ488464) tahun 2019 (Angeliya *et al.*, 2022), dan angsa di Jawa Timur tahun 2019 (Putri *et al.*, 2019) dengan susunan asam amino pada cleavage site 112RRQKR↓F117. Menurut OIE (2012), virus dengan pola urutan asam amino di cleavage site yang memiliki setidaknya tiga asam amino basa termasuk dalam strain velogenik. Virus pada burung merak ini berbeda dengan ND Lasota sebagai strain vaksin yang digunakan

pada peternakan unggas di Indonesia. Strain Lasota, urutan asam amino di situs pembelahan 112GRQGR↓L117, adalah NDV lentogenik.

Jarak genetik gen F antara virus ND asal burung merak diantara virus genotipe VII.2 lainnya adalah antara 0.024-0.042% dengan nilai homologi 95.8-97.6% (Tabel 3). Nilai ini hampir sama dengan hasil yang dilaporkan oleh Xiao *et al.* (2012) pada isolat asal Indonesia termasuk genotipe VII dengan nilai homologi antara 96-100%. Jarak genetik antara burung merak dan merpati adalah 14.4-14.7%, burung merak dan burung cormorant 17.3%. Virus ND dalam penelitian ini memiliki jarak genetik yang bervariasi dengan NDV dari inang yang berbeda dengan homologi antara 82.7-85.6% tercantum pada Tabel 3. Berdasarkan analisis tersebut, virus ND yang diisolasi dari burung merak memiliki jarak genetik yang lebih dekat dengan virus ND yang dilaporkan sebelumnya berasal dari ayam komersial dan buras di Indonesia dibandingkan dengan hospes burung liar dari negara lain. Burung liar juga dapat terinfeksi

ND dari kontaminasi NDV yang beredar pada ayam komersial (Xiang *et al.*, 2017).

Epitop netralisasi dari gen HN burung merak tidak berubah seperti NDV Indonesia sebelumnya (Tabel 2). Virus tersebut menunjukkan dua mutasi pada G494D dan I514V dibandingkan dengan strain vaksin Lasota (Li *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2016). Mutasi pada epitop netralisasi dari protein HN NDV dapat menghasilkan varian antigenik dan lolos dari netralisasi antibodi (Qin *et al.*, 2008; Snoeck *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2016). Analisis gen HN NDV dari burung merak memiliki 13 residu sistein yang lestari. Sistein berperan dalam menstabilkan struktur protein HN (McGinnes dan Morrison 1995; Ren *et al.*, 2016). Protein HN isolat ini mengandung enam situs N-glikosilasi potensial N-X-S/T pada 119, 341, 433, 481, dan 508, yang stabil. Peran karbohidrat terkait-N dalam glikoprotein HN untuk perlekatan sel. Tempat glikosilasi gen HN berperan penting dalam afinitas reseptor pada sel target sehingga terlibat dalam mempengaruhi virulensi NDV (Panda *et al.*, 2004).

### Kesimpulan

Virus yang diisolasi dari burung Merak adalah virus ND strain velogenik dengan pola *cleavage site* RRQKRF. Virus tersebut termasuk dalam genotip VII.2 yang dekat dengan virus ND yang bersirkulasi di Indonesia baik dilaporkan pada ayam komersil, ayam kampung maupun *wild bird*. Hasil studi ini sebagai informasi penyebaran virus ND menjadi ancaman terhadap burung liar di alam dan yang dikandangkan bahkan hewan yang dilindungi undang-undang. Burung juga berisiko menularkan pada ayam komersil ataupun sebaliknya.

**Saran:** Studi lebih lanjut perlu dilakukan, mengenai sebaran penyakit ND pada burung liar di alam maupun yang dikandangkan sehingga dapat menjadi acuan pengendalian penyakit ND pada burung liar yang dilindungi yang berpotensi dalam transmisi virus ND pada ayam komersial.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada BPPSDMP Kementerian pertanian yang telah mendukung biaya penelitian, kepada Kepala Balai Veteriner Lampung yang telah memberi izin penggunaan fasilitas laboratorium, kepada

DR. Drh. Jafrizal, M.M., yang telah mengirim specimen yang digunakan dalam penelitian ini. Terimakasih juga kepada rekan-rekan Medik dan paramedik di Balai Veteriner Lampung yang telah membantu keperluan selama di laboratorium

### Daftar Pustaka

- Alexander, D. J., and Senne, D. A. (2008). Newcastle Disease and Other Paramyxovirus Infection. *In: Disease of Poultry* 12<sup>th</sup> ed. Syaif, Y. M., Fadly, A.M., Glysson, J.R., Mc.Dougald, L.B., Nolan, L.K. and Swyne, D.E. *Blackwell publishing professional*, IOWA, USA: 75-100.
- Amarasinghe, G.K., Arechiga-Ceballos, N.G., Banyard, A.C., Basler, C.F., Bavari, S., Bennett, A.J., et al. 2018. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2018. *Arch Virol.* 163:2283–94.
- Angeliya, L. (2015). Phylogenetic Tree and Consensus Sequence Analysis of Newcastle Disease Virus Isolates in Disease Investigation Center Lampung Working Area from 2010 to 2013. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi Pertanian*. BPTP Lampung. Bandar Lampung, pp. 474-481.
- <http://lampung.litbang.pertanian.go.id/ind/images/stories/publikasi/prosiding2015-II/a-peternakan/1.pdf>
- Angeliya, L., Kristianingrum, Y.P., Asmara, W., Wibowo, M.H. (2022). Genetic characterization and distribution of the virus in chicken embryo tissue infected with Newcastle disease virus isolated from commercial and native chickens in Indonesia. *Veterinary World.* 15(6): 1467-1480.
- Anonim (2019). Laporan Tahunan Balai Veteriner Subang Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian.
- Anonim (2022). Laporan Tahunan Balai Veteriner Lampung Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian.

- Cattoli, G., Susta, L., Terregino, C., Brown, C., 2011. Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(4) 637–656.
- Ellakany, H.F., Elbestawy, A.R., El-Hamid, H.S.A., Zedan, R.E., Gado, A.R., Taha, A.E., Soliman, M.A., El-Hack, M.E.A., Swelum, A.A., Saadeldin, I.M., Ba-Awadh, H., and Hussein, E.O.S. (2019). Role of Pigeons in the Transmission of Avian Avulavirus, Newcastle Disease-Genotype VII<sub>d</sub> to Chickens. *Animals* 9.338.1
- Goraichuk, I.V., Williams-Coplin, D., Wibowo, M.H., Durr, P.A., Asmara, W., Artanto, S., Dimitrov, K.M., Afonso, C.L., Suarez, D.L. (2020). Complete Genome Sequences of 11 Newcastle Disease Virus Isolates of Subgenotype VII.2 From Indonesia. *Microbiology Resource Announcement* volume 9 issues 5 e01519-19.
- Garcia, S.C., Miller, P.J., Lopez, R.N., Afonso, C.L., Morales, R., Olvera, M.A., Marquez, M.A., Merino, R. (2013). Molecular Epidemiology of Newcastle Disease in Mexico and the Potential Spillover of Viruses from Poultry into Wild Bird Species. *Applied and Environmental Microbiology*. aem.asm.org Vol.79 No. 16. pp. 4985–4992.
- ICTV: International committee on taxonomy of viruses. 2020. Virus Taxonomy: 2020. Release in October 2020, Available at <https://ictv.global/taxonomy/taxondeetails?taxnodeid=20151029>
- Iorio RM, Syddall RJ, Sheehan JP, Bratt MA, Glickman RL, dan Riel AM. (1991). Neutralization Map of the HemagglutininNeuraminidase Glycoprotein of Newcastle Disease Virus: Domains Recognized by Monoclonal Antibodies That Prevent Receptor Recognition. *Journal of Virology*. 65(9): 4999-5006.
- Jindal, N., Chander, Y., and Chockalinga, A. K. (2009). Phylogenetic Analysis of Newcastle Disease Viruses Isolated from Waterfowl in The Upper Midwest Region of The United States. *Virology Journal*. 6: 191.
- Kommers, G. D., King D.J., Seal, B.S., Carmichael, K.P., Brown, C.C. (2002). Pathogenesis of Six Pigeon-Origin Isolates of Newcastle Disease Virus for Domestic Chickens. *Vet. Pathol* 39: pp. 353–362
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: pp. 1547-1549.
- Li, J., Ling, M., Sun, Y., Di, H., Cong, Y., Yu, H., Cong, Y. (2020). Characterization Of Newcastle Disease Virus Obtained from Toco Toucan. *J Vet Sci*. 21(2): E19).
- McGinnes LW and Morrison TG. (1995). The Role of Individual Oligosaccharide Chains in the Activities of The HN Glycoprotein of the NDV, *Virology* 212, pp. 398 – 410.
- Munir, M., Cortey, M., Abbas, M., Qureshi, Z.A., Afzal, F., Shabbir, M.Z., Khan, M.T., Ahmed, S., Saeed Ahmad, S., Claudia Baule, C., Ståhl, K., Zoharia, S., Bergaet, M. (2012). Biological characterization and phylogenetic analysis of a novel genetic group of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in commercial poultry and from backyard poultry flocks in Pakistan. *Infection, Genetics and Evolution*. Volume 12, Issue 5, July 2012, pp. 1010-1019
- Office International des Epizooties, OIE. (2012). Newcastle Disease. Manual Standards for Diagnostic Test and Vaccine: pp. 576-589.
- Panda, A., Elankumaran, S., Krishnamurthy, S., Huang, Z. & Samal, S.K. (2004). Loss of N-linked glycosylation from the hemagglutinin-neuraminidase protein alters virulence of Newcastle disease virus. *Journal of Virology*, 78, pp. 4965–4975
- Putri, N., Ernawati, R., Suwarno, Rahmahani, J. and Rantam, F.A. (2019). Fusion Protein of Amino Acid Mutations in Newcastle Disease Isolated from Swan Goose



- Caused Resistance to Infection. *Indian Vet. J.* 96, 10: pp. 53 - 55.
- Putri N, Ernawati R, Rahmahani J, Suwarno S, Rantam F.A. (2021) Phylogenetic relationship and genotype variation of six Newcastle disease viruses isolated from duck in Indonesia, *Veterinary World*, 14(1): pp. 276-284  
[www.veterinaryworld.org/Vol.14/January-2021/36.pdf](http://www.veterinaryworld.org/Vol.14/January-2021/36.pdf)
- Qin, Z. M., Tan, L. T. Xu, H. Y., Ma, B. C., Wang, Y. L., Yuan, X. Y., and Liu, W. J. (2008). Pathotypical Characterization and Molecular Epidemiology of Newcastle Disease Virus Isolates from Different Host in China from 1996 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology*. 46: pp. 601-611.
- Ren,S,Xie,X., Wang,Y., Tong,L., Gao, X., Jia,Y., Wang,X., Fan,M., Zhang, S., Xiao,S., Wang, X. & Yang, Z. (2016). Molecular characterization of a Class I Newcastle disease virus strain isolated from a pigeon in China. *Avian Pathology*, 45:4, pp. 408-417,
- Snoeck, C.J., Marinelli,M., Charpentier,E., Sausy,A., Conzemius, T., Losch, S., Muller, C.P. (2013). Characterization of Newcastle Disease Viruses in Wild and Domestic Birds in Luxembourg from 2006 to 2008. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 79 Number 2 pp. 639–645.
- Stone-Huslander, J. and Morrison, T.G. (1997). Detection of an Interaction between the HN and F protein in Newcastle Disease Virus Infected Cells. *J. Virol* 71: pp. 6287 – 6295
- Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101: pp. 11030-11035.
- Wibowo, S.E., Wibowo, M.H. and Sutrisno, B , (2017). Penentuan Patogenesitas Molekuler Virus *Newcastle Disease* yang Diisolasi dari Ayam Komersial Tahun 2013-201. *ACTA VETERINARIA INDONESIA*. Vol. 5, No. 2: pp. 105-119.
- Wise, M. G., Sellers, H. S., Alvarez, R., and Seal, B. S. (2004). RNA-Dependent RNA Polymerase Gene Analysis of Worldwide Newcastle. *Virus Research* 104: 71-80.
- Xiang, B., Han, L., Gao, P., You, R., Wang, F., Xiao, J., Liao, M., Kang, Y., Ren, T. (2017). Spillover of Newcastle disease viruses from poultry to wild birds in Guangdong province, southern China. *Infection, Genetics and Evolution*. 55: pp. 199–204.
- Xiao, S., Paldurai, A., Nayak, B., Samuel, A., Bharoto, E. E., Prajitno, T. Y., Collins, P. L., and Samala, S. K., 2012. Complete Genome Sequences of Newcastle Disease Virus Strains Circulating in Chicken Populations of Indonesia. *Journal of Virology*: pp. 5969-5970.
- Zhu, J., Hu, S., Xu, H., Liu, J., Zhao, Z., Wang, X. and Liu, X. (2016.) Characterization of virulent Newcastle Disease viruses from vaccinated chicken flocks in Eastern China. *BMC Vet. Res.*, 12: pp. 113.

**DAFTAR TABEL**

Tabel 1. Konstitusi asam amino dalam cleavage site, epitop netralisasi, glycosylation site dari protein F dan nomer akses pada genbank.

| No. | Isolat                              | Acc.No     | Cleavage site | Glycosylation site          |    |    |    |    |         |     |   |   |                       | Epitop Netralisasi |  |  |  |  |
|-----|-------------------------------------|------------|---------------|-----------------------------|----|----|----|----|---------|-----|---|---|-----------------------|--------------------|--|--|--|--|
|     |                                     |            |               | 72                          | 74 | 75 | 78 | 79 | 151-171 | 343 |   |   |                       |                    |  |  |  |  |
| 1   | Elang P08190060-005                 | MW811474   | KRQKRF        | 85, 191, 366, 447, 471, 541 | D  | E  | A  | K  | A       | K   | A | A | ILRLKESIAATNEAVHEVTDG | L                  |  |  |  |  |
| 2   | Elang P08190060-004                 | MW811476   | KRQKRF        | 85, 191, 366, 447, 471, 541 | D  | E  | A  | K  | A       | K   | A | A | ILRLKESIAATNEAVHEVTDG | L                  |  |  |  |  |
| 3   | Broiler ISW19                       | MZ488460   | RRQKRF        | 85, 191, 366, 447, 471, 541 | D  | E  | A  | K  | A       | K   | A | A | ILRLKESIAATNEAVHEVTDG | L                  |  |  |  |  |
| 4   | Broiler A032009017                  | MZ488461   | GKQGRL        | 85, 191, 366, 447, 471, 541 | D  | E  | A  | K  | A       | K   | A | A | ILRLKESIAATNEAVHEVTDG | L                  |  |  |  |  |
| 5   | Layar DOCHTN20                      | MZ488467   | RRQKRF        | 85, 191, 366, 447, 471, 541 | D  | E  | A  | K  | A       | K   | A | A | ILRLKESIAATNEAVHEVTDG | L                  |  |  |  |  |
| 6   | NDV strain Lasota                   | DQ195265.1 | GRQGRL        | 85, 191, 366, 447, 471, 541 | D  | E  | A  | K  | A       | K   | A | A | ILRLKESIAATNEAVHEVTDG | L                  |  |  |  |  |
| 7   | NDV strain B1 Takaaki               | AF375823.1 | GRQGRL        | 85, 191, 366, 447, 471, 541 | D  | E  | A  | K  | A       | K   | A | A | ILRLKESIAATNEAVHEVTDG | L                  |  |  |  |  |
| 8   | NDV Layer Indonesia BYL 2014        | MN557410.1 | RRQKRF        | 85, 191, 366, 447, 471, 541 | D  | E  | A  | K  | A       | K   | A | A | ILRLKESIAATNEAVHEVTDG | L                  |  |  |  |  |
| 9   | NDV Broiler Indonesia Muntilan 2014 | MN557402.1 | RRQKRF        | 85, 191, 366, 447, 471, 541 | D  | E  | A  | K  | A       | K   | A | A | ILRLKESIAATNEAVHEVTDG | L                  |  |  |  |  |
| 10  | ♦ Peacock P032105010                | MZ488468   | RRQKRF        | 85, 191, 366, 447, 471, 541 | D  | E  | A  | K  | A       | K   | A | A | ILRLKESIAATNEAVHEVTDG | L                  |  |  |  |  |

Tabel 2. Konstitusi asam amino dalam glycosylation site, Reseptor binding site, epitop netralisasi dari protein HN dan nomer akses pada genbank.

| No | Isolat                              | Acc.No     | Reseptor Binding Site   |     |     |         |          | Epitope Netralisasi |     |         |         |           |     |         |           |  |  |
|----|-------------------------------------|------------|-------------------------|-----|-----|---------|----------|---------------------|-----|---------|---------|-----------|-----|---------|-----------|--|--|
|    |                                     |            | 401                     | 416 | 526 | 193-201 | 263      | 287                 | 321 | 332-333 | 345-353 | 356       | 494 | 513-521 |           |  |  |
| 1  | Elang P08190060-005                 | MW811477   | 119, 341, 433, 508, 538 | E   | R   | Y       | LSGCRDHS | K                   | D   | N       | GK      | PDEQDYQIR | K   | D       | RVTRVSSSS |  |  |
| 2  | Elang P08190018-013                 | MW811478   | 119, 341, 433, 508, 538 | E   | R   | Y       | LSGCRDHS | K                   | D   | N       | GK      | PDEQDYQIR | K   | D       | RVTRVSSSS |  |  |
| 3  | Broiler A032009017                  | MZ488470   | 119, 341, 433, 508, 538 | E   | R   | Y       | LSGCRDHS | N                   | D   | N       | GK      | PDEQDYQIR | K   | D       | RVTRVSSSN |  |  |
| 4  | Layar DOCHTN20                      | MZ488476   | 119, 341, 433, 508, 538 | E   | R   | Y       | LSGCRDHS | K                   | D   | N       | GK      | PDEQDYQIR | K   | D       | RVTRVSSSN |  |  |
| 5  | Chicken BRS20                       | MZ488472   | 119, 341, 433, 508, 538 | E   | R   | Y       | LSGCRDHS | N                   | D   | N       | GK      | PDEQDYQIR | K   | G       | RITRVSSSS |  |  |
| 6  | NDV strain Lasota                   | DQ195265.1 | 119, 341, 433, 508, 538 | E   | R   | Y       | LSGCRDHS | N                   | D   | N       | GK      | PDEQDYQIR | K   | G       | RITRVSSSS |  |  |
| 7  | NDV strain B1 Takaaki               | AF375823.1 | 119, 341, 433, 508, 538 | E   | R   | Y       | LSGCRDHS | N                   | D   | N       | GK      | PDEQDYQIR | K   | G       | RITRVSSSS |  |  |
| 8  | NDV Layer Indonesia BYL 2014        | MN557410.1 | 119, 341, 433, 508, 538 | E   | R   | Y       | LSGCRDHS | K                   | D   | N       | GK      | PDEQDYQIR | K   | D       | RVTRVSSSN |  |  |
| 9  | NDV Broiler Indonesia Muntilan 2014 | MN557402.1 | 119, 341, 433, 508, 538 | E   | R   | Y       | LSGCRDHS | K                   | D   | N       | GK      | PDEQDYQIR | K   | D       | RVTRVSSSS |  |  |
| 10 | ♦ Peacock P032105010                | MZ488477   | 119, 341, 433, 508, 538 | E   | R   | Y       | LSGCRDHS | K                   | D   | N       | GK      | PDEQDYQIR | K   | D       | RVTRVSSSS |  |  |

Tabel 3. Jarak genetik berdasarkan gen F antara virus ND dalam penelitian ini dan virus ND dari berbagai genotipe yang diperoleh dari data di GenBank

| No. | Virus Newcastle Disease  | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    | 20    | 21    | 22 |
|-----|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 1   | KU377533.1_Pigeon_10VIR7155/turtledove/Italy/2010 (G XXI.2)                        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 2   | KC433530.1_NDV_Comorant/Florida/41105/2012 (G XIX)                                 | 0.179 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 3   | KY042142.1_Quail/SouthKorea/88-M/5/14/1988 (G XX)                                  | 0.101 | 0.147 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 4   | JX915242.1_Avian_orthoavulavirus_1_chicken/Dominican Republic/28138-4/1986 (G XVI) | 0.157 | 0.179 | 0.134 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 5   | JX518885.1_NDV_2010_Mali_ML57051T (G XVIII)  | 0.153 | 0.167 | 0.116 | 0.162 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 6   | AY865652.1_NDV_Sterna/Astr/2755/2001 (G XIII)                                      | 0.131 | 0.163 | 0.113 | 0.151 | 0.111 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 7   | KC152048.1_Avian_orthoavulavirus_1_isolate_GD450/2011 (G XII)                      | 0.143 | 0.167 | 0.112 | 0.150 | 0.103 | 0.093 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 8   | JX518875.1_NDV_2009_Madagascar_MGBBS (G XI)  | 0.205 | 0.216 | 0.176 | 0.198 | 0.204 | 0.194 | 0.208 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 9   | KX857721.1_Avian_orthoavulavirus_1_Mallard/USA/MN/AI 10-3434/2010 (G X)            | 0.186 | 0.198 | 0.164 | 0.165 | 0.179 | 0.177 | 0.167 | 0.183 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 10  | KT381605.1_NDV_Duck/Guangdong/YF18/2014 (G IX)                                     | 0.164 | 0.173 | 0.134 | 0.148 | 0.160 | 0.147 | 0.153 | 0.151 | 0.115 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 11  | JX012096.2_NDV_strain_AF2240-1 (G VIII)  | 0.117 | 0.126 | 0.083 | 0.106 | 0.110 | 0.106 | 0.104 | 0.153 | 0.135 | 0.103 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 12  | MN557410.1_Avian_orthoavulavirus_1_layer/Indonesia/BYL2-I10/981/2014 (G VII.2)     | 0.134 | 0.161 | 0.105 | 0.151 | 0.115 | 0.097 | 0.104 | 0.196 | 0.165 | 0.149 | 0.098 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 13  | KY042129.1_Avian_orthoavulavirus_1_pigeon/Egypt/Giza/11 /1088/2015 (G XXI.1.1)     | 0.086 | 0.163 | 0.088 | 0.155 | 0.133 | 0.124 | 0.124 | 0.202 | 0.188 | 0.154 | 0.101 | 0.120 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 14  | KT381592.1_NDV_Pigeon/Guangdong/GZ293/2014 (G VI)                                  | 0.113 | 0.169 | 0.096 | 0.152 | 0.146 | 0.138 | 0.136 | 0.195 | 0.182 | 0.166 | 0.105 | 0.136 | 0.105 |       |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 15  | JQ697744.1_Avian_orthoavulavirus_1_chicken/MX/NC04-635/2010 (G V)                  | 0.149 | 0.095 | 0.114 | 0.135 | 0.136 | 0.127 | 0.130 | 0.178 | 0.160 | 0.131 | 0.088 | 0.133 | 0.133 | 0.141 |       |       |       |       |       |       |       |    |
| 16  | AY741404.1_NDV_strain_Herts/33 (G IV)  | 0.135 | 0.153 | 0.108 | 0.119 | 0.133 | 0.126 | 0.129 | 0.116 | 0.110 | 0.074 | 0.078 | 0.120 | 0.131 | 0.136 | 0.112 |       |       |       |       |       |       |    |
| 17  | KY247177.1_Avian_orthoavulavirus_1_strain_SH15 (G III)                             | 0.169 | 0.177 | 0.143 | 0.156 | 0.160 | 0.154 | 0.154 | 0.164 | 0.125 | 0.085 | 0.111 | 0.144 | 0.162 | 0.169 | 0.137 | 0.072 |       |       |       |       |       |    |
| 18  | DQ195265.1_NDV_strain_Lasota (G II)  | 0.198 | 0.189 | 0.167 | 0.181 | 0.191 | 0.188 | 0.183 | 0.196 | 0.110 | 0.120 | 0.145 | 0.182 | 0.190 | 0.187 | 0.166 | 0.117 | 0.126 |       |       |       |       |    |
| 19  | D00243.1_Avian_orthoavulavirus_1 (G I)   | 0.160 | 0.176 | 0.138 | 0.147 | 0.163 | 0.146 | 0.153 | 0.167 | 0.088 | 0.086 | 0.107 | 0.136 | 0.155 | 0.166 | 0.143 | 0.079 | 0.090 | 0.103 |       |       |       |    |
| 20  | EF564833.1_NDV_Canada_goose/US(OH)/87-78/1987 (NDV class I)                        | 0.421 | 0.432 | 0.405 | 0.409 | 0.424 | 0.416 | 0.409 | 0.434 | 0.382 | 0.416 | 0.401 | 0.434 | 0.423 | 0.421 | 0.409 | 0.404 | 0.393 | 0.409 | 0.396 |       |       |    |
| 21  | MZ488464_Chicken/Indonesia/M-Enim/P031909005/2019 (G VII.2)                        | 0.145 | 0.173 | 0.113 | 0.161 | 0.127 | 0.108 | 0.119 | 0.200 | 0.172 | 0.157 | 0.108 | 0.020 | 0.126 | 0.149 | 0.144 | 0.129 | 0.154 | 0.194 | 0.146 | 0.433 |       |    |
| 22  | MZ488468_Peacock/Indonesia/Palembang/A032105010/2021 (G VII.2) (★)                 | 0.146 | 0.173 | 0.116 | 0.163 | 0.125 | 0.114 | 0.116 | 0.207 | 0.174 | 0.163 | 0.110 | 0.024 | 0.131 | 0.147 | 0.144 | 0.132 | 0.152 | 0.193 | 0.151 | 0.436 | 0.042 |    |