

Türkiye'de Çeşitli Bölgelerden İzole Edilen Çok Virulent İnfeksiyöz Bursal Hastalığı Viruslarının Antijenik Benzerlikleri

Olca TÜRE

Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, 35010 Bornova, İzmir-TÜRKİYE

Fethiye ÇÖVEN, Sabahattin İÇİN

Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü, 45040 Manisa-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 05.02.1997

Özet: Türkiye'de 1990'lı yıllarda yaşanan infeksiyöz bursal hastalığı (IBD) salgınlarından izole edilen 4 adet çok virulent infeksiyöz bursal hastalığı virusu, (Ege: G34, G35.; Marmara: G41; İç Anadolu: ETL3) arasındaki antijenik benzerlikler, serotip 1 grubu klasik D78 suşu, varyant E (Ev) suşu ve serotip 2 grubu OH virusu ile karşılaştırmalı olarak kros virus nötralizasyon (VN) testi ile incelendi. Bütün viruslar için karşılıklı antijenik yakınlık değerleri (R=relatedness ratio) minimum üç testin geometrik ortalaması alınarak hesaplandı.

Kros-nötralizasyon çalışmasında, bölgelere ait çok virulent viruslar arasındaki iki antijenik alt-tip bulunduğu görüldü. Klinik olgulardan izole edilen G34, G41 ve ETL3 virusları, klasik D78 suşu ile antijenik olarak çok yakın bulundu ve aynı alt-tip altında sınıflandırıldı. Aynı izoleler Ev ile antijenik yönden farklı bulundu. Subklinik enfeksiyondan izole edilen G35 suşu, D78, G34 ve ETL3 suşlarından antijenik olarak az farklı olması nedeniyle başka bir alt-grup içinde değerlendirildi. Diğer yandan, G35 ile G41 izoleleri arasında yakın antijenik ilişki saptandı. Çok virulent saha virusları veya serotip 1 grubu referens suşları ile serotip 2 grubu OH virusu arasında nötralizasyon saptanmadı.

Bu çalışmanın sonucuna göre, Türkiye'de akut salgınlara neden olan çok virulent IBD viruslarının büyük çoğunluğunun klasik antijenik yapıda olduğu saptandı ve gerçek antijenik varyant IBD virusuna rastlanmadı.

Anahtar Sözcükler: Çok Virulent IBDV, Kros-VN, Antijenik Benzerlik, Alt-Grup.

Antigenic Relatedness of Highly Virulent Infectious Bursal Disease Viruses Isolated From Different Regions of Turkey

Abstract: Antigenic relatedness of 4 highly virulent infectious bursal disease viruses (Aegean: G34, G35; Marmara: G41; Central Anatolia: ETL3) isolated from infectious bursal disease outbreaks that occurred during 1990's in Turkey were investigated comparatively with the reference serotype 1 classic D78 strain, variant E (Ev) and serotype 2 OH viruses by cross virus neutralization (VN). Antigenic relatedness values (R) for all the viruses were calculated from geometric mean antibody titers of minimum of three tests.

Cross-neutralization studies indicated that there are 2 antigenic sub-groups exist among the regional highly virulent viruses. G34, G41 and ETL3 strains that were isolated from clinical cases were found to be antigenically very similar to standard D78 strain and classified as one sub-group. These same isolates were found to be antigenically distinct from Ev. The G35 which was isolated from a subclinical infection was classified in another sub-group, because it was different antigenically from D78, G34 and ETL3, but on the other hand closely related to G41. No neutralization was detected between the serotype 2 OH virus and the very virulent field viruses or the reference serotype 1 viruses.

According to the results of this study, the majority of the highly virulent viruses causing acute disease outbreaks in Turkey were found to belong to classic antigenic group and no real antigenic variant infectious bursal disease virus was detected.

Key Words: Highly Virulent IBDV, Cross-VN, Antigenic Relatedness, Subtypes.

Giriş

İnfeksiyöz bursal hastalığı (IBD) 3-6 haftalık yaş dönemindeki piliçlerin akut, çok bulaşıcı, immunosupresif viral bir hastalığı olup, bursa Fabricius'un (BF) şiddetli yangısı ile karakterizedir (1, 2). Gumboro hastalığı olarak da bilinen bu hastalık ilk kez 1962 yılında Cosgrove tarafından rapor edilmiştir (2).

Gumboro hastalığı viruslarının iki serotipi mevcuttur (3, 4, 5). Sadece serotip 1 grubu virusları tavuklar için patojendir ve antijeniteleri ve patojeniteleri bakımından oldukça çeşitlilik gösterirler (5-10). 1980'li yıllarda *in vitro* kros-çalenç çalışmaları sonucunda serotip 1 grubu viruslarının antijenik olarak çok homojen olmadıkları ortaya konmuştur (4, 5, 11). A.B.D.'de toplam 13 adet

aşı ve saha virusunu içeren kros-VN çalışmasında 6 farklı alt-tip tesbit edilmiştir (12). Bu alt-tiplerden bir tanesi de varyant virusların içinde bulunduğu gruptur. 1984-85 yıllarında A.B.D.'nin Delaware eyaletinde "klasik" veya "standart" olarak bilinen viruslardan farklı antijenik yapıda "varyant" adı verilen suşlar izole edilmiştir (9, 11, 13, 14). Serotip 1 grubunda yer almalarına rağmen varyant virusların klasik serotip 1 grubu aşısı virusuyla aşılansın veya maternal antikörlerle korunan sürülerde subklinik enfeksiyonlar meydana getirdiği gözlenmiş ve bu suşların hem antijenik hemde patojenik olarak klasik viruslarda farklı oldukları ortaya konmuştur (14). Klasik virusların aksine varyant viruslar BF'ta minimal bir yangıya fakat hızlı bir atrofiye neden olmaktadır (14, 15). Öncelikle gerçek antijenik varyantlar olmak üzere serotip 1 grubundaki antijenik alt-tiplerin sahadaki aşısı başarısızlıklarında rollerinin olduğu düşünülmektedir (5, 6, 11, 12). O nedenle, bir ülke veya bölgede serotip 1 grubu içindeki alt-tiplerin ortaya konması yeni aşılar ve aşılama programları geliştirilmesi açısından çok önemlidir.

1987 yılında Belçika'da başlayarak Avrupa, Orta Doğu, Güney Afrika ve Uzak Doğu ülkelerine kısa sürede yayılan (16-24) ve ülkemizde de 1990 yılından bu yana büyük ekonomik kayıplara neden olan çok virulent IBD viruslarının neden olduğu salgınlar yaşanmıştır (17, 25, 27). Yoğun aşılamalara rağmen başlangıçta enfeksiyonun broylerlerde %5-30, yumurtacılar da %70 gibi yüksek oranda ölümlerle seyretmesi Avrupa'daki IBD viruslarının da A.B.D.'de olduğu gibi antijenik değişime uğramış olabileceğini akla getirmiştir, ancak yapılan çalışmalar Avrupa, Asya ve Afrika'daki salgın viruslarının serotip 1 grubunda klasik antijenik yapıda olduklarını ortaya koymuştur (28-36).

Türkiye'de salgına neden olan virusların serotip 1 grubunda yer aldıkları daha önce tarafımızdan yapılan bir çalışma ile ortaya konmuştur (34), ancak bütün patojen virusların serotip 1 grubunda yer almaları nedeniyle serotiplerin ortaya konması sahadaki problemlerin nedenini anlamaya yeterli değildir. Ülkemizde sahadaki virusların antijenik yapılarını ortaya koymak, Türkiye'de varyant virus bulunup bulunmadığı konusundaki tartışmalara kısmi de olsa bir açıklık getirmek, aşılama stratejilerinin oluşturulmasına katkıda bulunmak üzere bu çalışma planlanmıştır. Bu projenin spesifik amacı, ülkemizde çeşitli bölgelere ait çok virulent virusların kendi aralarındaki ve de referens klasik ve varyant IBD suşlarıyla olan antijenik ilişkilerini karşılaştırmalı olarak incelemektir.

Materyal ve Metot

Spesifik-Patojen-Free (SPF) Yumurta ve Cıvıv: Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü SPF sürülerinden sağlandı.

Hücre Kültürü: Virusların çoğaltılmasında ve VN testlerinde kullanılan cıvıv embriyo fibroblast (CEF) hücre kültürleri daha önce açıklanan yöntemle göre hazırlandı (26).

Referens Viruslar: Kros-VN çalışmasında referens olarak Dr.Y.M.Saif ten (Food Animal Health Research Program, OARDC, Wooster, OH) sağlanan iki adet serotip 1 grubu virusu, D78 ve Ev, ve bir adet serotip 2 virusu OH suşu kullanıldı.

Saha Virusları: Kros-VN testleride daha önceki bir çalışmada (26) serotip 1 grubunda yer aldığı belirlenen 4 adet çok virulent IBDV kullanıldı. G34 ve G35 suşları Ege Bölgesinden, G41 suşu Marmara Bölgesinden ve ETL3 İç Anadolu Bölgesinden orijin almakta idi. G34, G41 ve ETL3 suşları broylerdeki akut klinik vakalardan, G35 suşu yumurtacı sürüdeki bir subklinik vakadan Dr. Aysel Ergün tarafından izole edilerek çalışmamıza verildi.

Stok Virus: Saha virusları ve referens viruslar CEF hücrelerinde çoğaltıldı. İnkubasyonun 5 ci gününde kültürler üç kez dondurulup çözdürüldü, supernatant düşük devirde santrifuj edilerek hücre artıkları çöktürüldü. Kültür sıvısı 0.45 um filtreden (Sartorius AG, Göttingen, Almanya) geçirildi ve küçük birimlere bölündükten sonra -20°C de saklandı. Stok virus Reed & Muench yöntemine göre titre edildi (37).

Antiserumlar: Referens viruslara (D78, Ev, OH) ve bölgeleri temsilen seçilmiş (G34, G35, G41, ETL3) saha viruslarına karşı antiserumlar izolatörde tutulan 3 haftalık SPF piliçlerde daha önce açıklanan prosedüre göre hazırlandı (26).

Kros-Virus Nötralizasyon Testi: Referens viruslar (D78, Ev) ve dört adet saha virusunun (G34, G35, G41, ETL3)antijen ve antiserumları karşılıklı homolog ve heterolog reaksiyonlara sokularak sabit virus değişken antikor titresi esasına dayanan beta-nötralizasyon tekniği ile test edildi (3, 26). Testlerde, 100TCID₅₀/25 ul oranına ayarlanmış virus kullanıldı. Her test en az 3 kez tekrarlandı ve geometrik ortalamalar esas alındı.

Antijenik Benzerliğin Belirlenmesi: Antijenik benzerliği gösteren R eğerleri, kros-virus nötralizasyon testinde elde edilen antikor titrelerinin aşağıda açıklanan Archetti & Horsfall formulüne uygulanmasıyla hesaplandı (38).

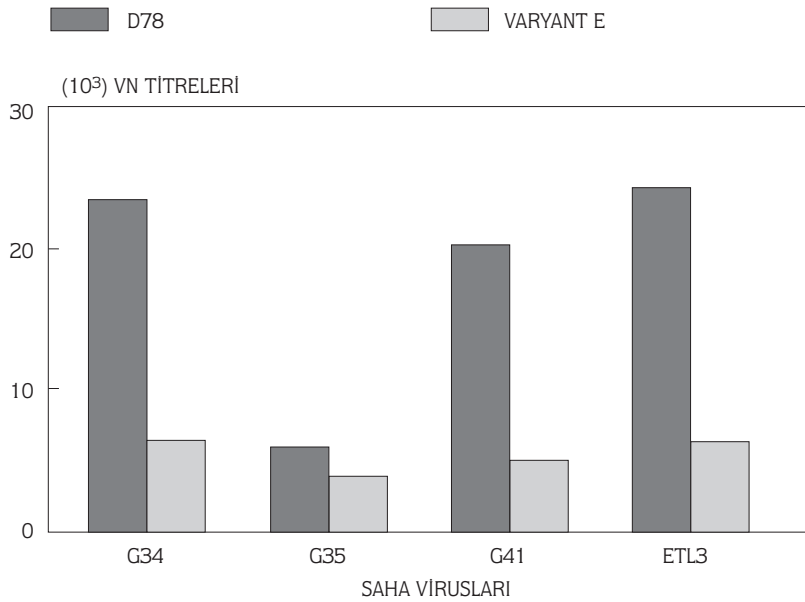
$$R = \sqrt{\frac{r_1 \times r_2}{r_1 \times r_2}} \quad r_1 = \text{heterolog titre (virus 2)} \quad r_2 = \text{heterolog titre (virus 1)}$$
$$\text{homolog titre (virus 1)} \quad \text{homolog titre (virus 2)}$$

	G41	G34	ETL3	D78	G35	Ev	OH
G41 ^a	1.00						
G34 ^a	0.61	1.00					
ETL3 ^a	0.70	0.73	1.00				
D78	0.79	0.92	0.86	1.00			
G35 ^b	1.04	0.49	0.56	0.32	1.00		
Ev	0.25	0.24	0.31	0.19	0.36	1.00	
OH	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	1.00

^aSaha viruslarında birinci antijenik alt-grubu temsil etmektedir.

^bSaha viruslarında ikinci antijenik alt-gruptur.

Tablo 1. Türkiye IBD Viruslarının ve Referens Suşların Antijenik Benzerlikleri.



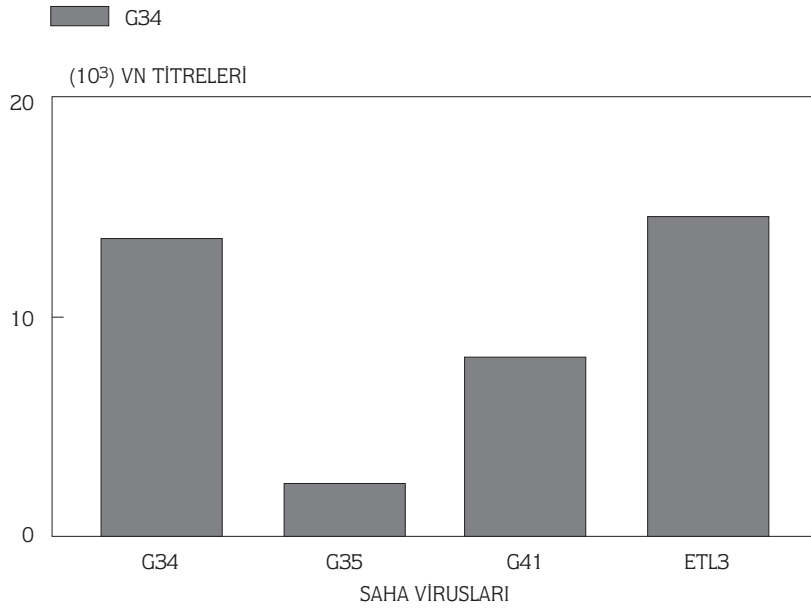
Şekil 1. Ege (G34, G35), Marmara (G41) ve İç Anadolu (ETL3) Bölgelerine ait IBD Saha Viruslarının D78 ve E Varyant Referens Antiserumları ile Tek Yönlü VN Sonuçları.

Kros nötralizasyon testinde hem antijen hemde antiserum karşılıklı kullanılarak test edildiğinde iki virus arasındaki antijenik ilişkiyi gösteren R değeri homolog virus için 1 olarak kabul edildi (12). Bu yöntemde 1 ve 1'e yakın değerler antijenik benzerliğin yakın olduğunu göstermektedir. R değerine göre benzerlikler şu şekilde yorumlandı (39).

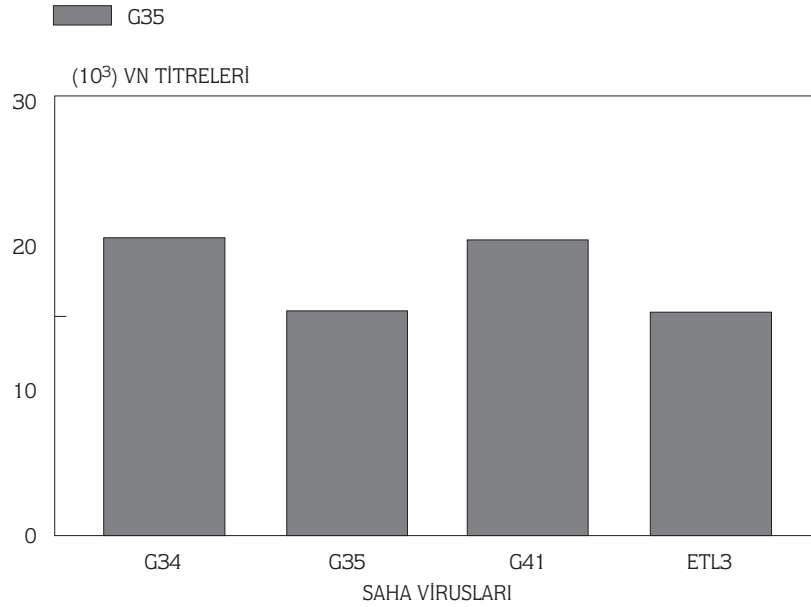
R= <0.10	Farklı serotip
R= 0.10 - 0.32	Çok farklı sub-tip (alt-tip)
R= 0.32 - 0.70	Az farklı sub-tip
R= 0.70 - 1.00	Fark çok az veya fark yok

Bulgular

Kros Virus Nötralizasyon Test Sonuçları: Dört saha virusunun tek yönlü VN'de D78 ve Ev antiserumlarına karşı oluşturduğu titreler Şekil 1'de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi G34, G41 ve ETL3 suşları klasik IBD virusu D78 ile Ev suşuna göre daha yüksek titrelerde nötralizasyon oluşturdu. G35 suşunun iki referens serotip 1 grubu virusu ile oluşturduğu titreler arasındaki farkın diğer 3 saha virusuna göre daha az olduğu görüldü. G34, G35, G41 ve ETL3 suşlarına karşı hazırlanan antiserumlarla homolog ve heterolog virusların virus nötralizasyon test sonuçları sırasıyla Şekil 2., 3., 4., ve 5.'te gösterilmiştir. Bu grafikler değerlendirildiğinde, viruslar arasında homolog ve heterolog reaksiyonlarda



Şekil 2. Ege Bölgesi G34 Suşu Antiserumu ile IBD Saha Viruslarının Tek Yönlü VN Sonuçları.

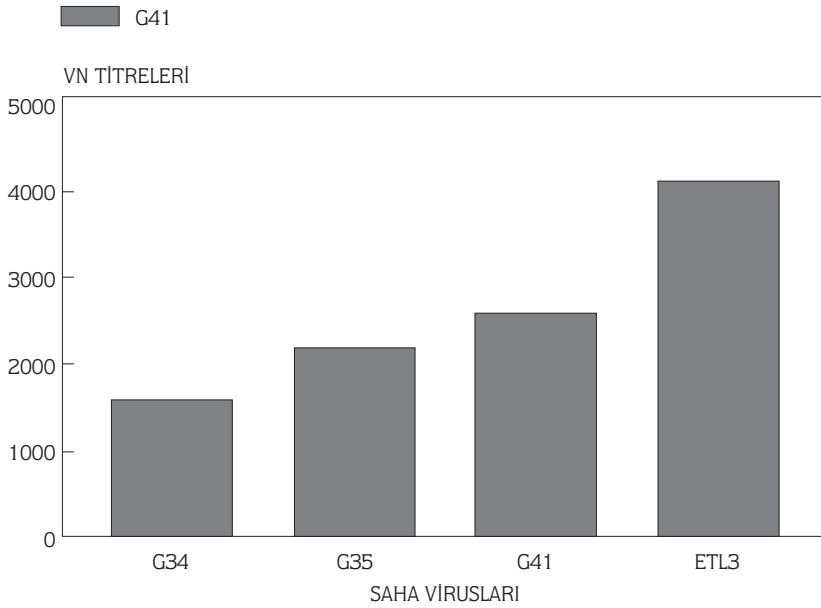


Şekil 3. Ege Bölgesi G35 Suşu Antiserumu ile IBD Saha Viruslarının Tek Yönlü VN Sonuçları.

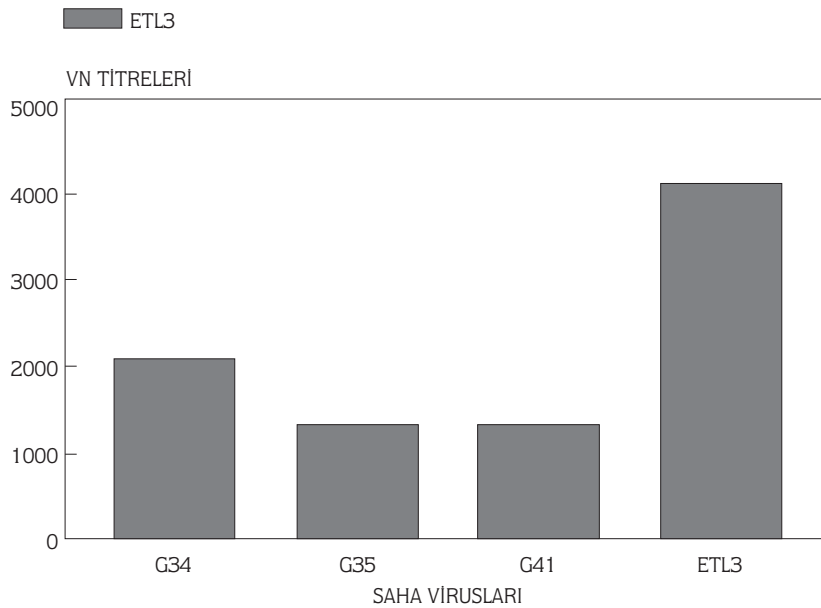
değişken titreler elde edildiği görüldü. Bu sonuçların yorumu tek yönlü VN'e göre değil, çift yönlü titreler formül ile değerlendirildikten sonra elde edilen R değerine göre yapıldı.

Saha ve Referens Viruslar Arasında Antijenik Benzerlikler: Kros-VN testleri ile belirlenen titrelerin Archetti & Horsfall formülüne uygulanması ile bulunan saha ve referens viruslar arasındaki antijenik ilişkilerin oranını gösteren R değerleri Tablo 1'te gösterilmiştir.

Homolog reaksiyonda R değeri 1.00 olarak kabul edilmiştir. Standart veya klasik antijenik gruba ait D78 suşunun Marmara Bölgesi izolesi G41, Ege Bölgesi izolesi G34 ve İç Anadolu Bölgesi izolesi ETL3 ile aralarındaki R değerleri sırasıyla 0.79, 0.92, 0.86 olarak bulundu. Aynı izolelerin Ev ile olan ilişkileri sırasıyla 0.25, 0.24 ve 0.31 olarak saptandı. D78 ile Ev arasındaki R değeri 0.19 bulundu. D78 ile Ege Bölgesindeki subklinik bir enfeksiyondan izole edilen G35 suşu arasında 0.32



Şekil 4. Marmara Bölgesi G41 Susu Antiserumu ile IBD Saha Viruslarının Tek Yönlü VN Sonuçları.



Şekil 5. İç Anadolu Bölgesi ETL3 Suşu Antiserumu ile IBD Saha Viruslarının Tek Yönlü VN Sonuçları.

oranında benzerlik saptanırken, G35 ile Ev arasında bu oranın (0.36) biraz daha yüksek olduğu gözlemlendi. Marmara Bölgesi suşu G41 ile Ege Bölgesi suşu G34 arasında 0.61 oranında benzerlik bulunurken, aynı bölgeden G35 suşu ile 1.04 R değeri ile yüksek antijenik benzerlik gösterdiği saptandı. G41 ile İç Anadolu suşu ETL3 arasındaki R değeri 0.70 olarak gözlemlendi. G34 ile ETL3 arasında 0.73 oranında bir benzerlik olduğu görüldü. G34 suşunun izole edildiği Ege Bölgesindeki diğer bir virus G35 ile 0.49 oranında homojenlik

gösterdiği saptandı. G35 ile İç Anadolu suşu ETL3 suşları 0.56 oranında benzerlik gösterdi.

Serotip 2 grubu OH virusu serotip 1 grubundaki diğer referans ve saha virüsleriyle nötralizasyon testi ile saptanabilen bir antijenik benzerlik göstermedi.

Tartışma

İnfeksiyöz bursal hastalığında serotip ve subtiplerin

ortaya konması önemlidir, çünkü sadece serotip 1 grubu virusları tavuklarda hastalık meydana getirmektedir (40, 41) ve serotip 1 grubu içinde de antijenik yönden farklı alt-tipler bulunmaktadır (5, 10, 12, 42). Sahada bütün diğer kurallar yerine getirilmesine rağmen aşı uygulamalarında başarısız sonuç alınıyor ise, düşünülmesi gereken önemli unsurlardan birisi de aşı virusu ile saha virusu arasındaki antijenik farklılıktır.

Ülkemizde 90'lı yıllarda her türlü aşuların ve aşılama programlarının kullanılmasına rağmen Gumboro hastalığı salgınlarının devam etmesi, diğer faktörlerin yanında virusların antijenik yapı çeşitliliğinin de korunmada başarısızlık nedenlerinden biri olabileceğini aklı getirmektedir. Bu hipotezi ortaya koymak üzere planlanan bu çalışmada Marmara, Ege ve İç Anadolu bölgelerinden izole edilen serotip 1 grubu saha suşlarının kendi aralarındaki ve referans suşlarla olan antijenik benzerliklerinin düzeyi kros-nötralizasyon testlerine dayandırılarak saptanmıştır. Saha viruslarının seçiminde, CEF'te üreme kolaylıkları, her bölgeyi temsil etmeleri, subklinik ve klinik enfeksiyonlardan orijin almaları, serotiplendirmedeki test sonuçları kriter olarak alınmıştır. Virusların antijenik/immunojenik özelliklerinin belirlenmesinde ideal olan sistem *in vivo* hayvan denemeleridir, ancak *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen kros virus nötralizasyon testlerinin de enfeksiyöz bursal hastalığı viruslarının antijenik ilişkilerini en yakın olasılık ile tahmin edici bir yöntem olduğu daha önce yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (6, 12).

Bu çalışmada tek yönlü VN'de saha viruslarının D78 antiserumu ile Ev'a göre daha yüksek titrelerde nötralize olmaları saha viruslarının antijenik olarak klasik gruba yakın olduklarını göstermektedir. Diğer yandan Ege Bölgesinden izole edilen G35 suşunun klasik ve varyant referans virus ile oluşturduğu titreler arasında daha az fark olduğunun görülmesi, bu izolenin antijenik subtip olabileceğini göstermiştir. Bu tezleri kanıtlamak, için yapılan kros-virus nötralizasyon çalışmasının sonucuna göre, G34, G41 ve ETL3 no'lu izolelerin D78 virusu ile antijenik olarak çok yakın (>0.70) oldukları, dolayısıyla "standart" veya "klasik" grupta yer aldıkları ortaya konmuştur. Aynı virusların Amerikan varyant suşu Ev ile R değeri 0.32'nin altında olmak üzere, farklı antijenik yapıda oldukları bulunmuştur. Subklinik enfeksiyondan orijin alan Ege Bölgesinin diğer izolesi G35 suşu G41 suşu ile 1.04 gibi yüksek bir R değeri göstermesine rağmen, G34 ile 0.49, ETL3 ile 0.56 ve D78 ile 0.32 oranlarında benzerlik gösterdiği için diğerlerinden az farklı bir antijenik alt-tip olarak sınıflandırılmıştır. G41 suşu ile G34 suşu arasında da az farklı (0.61) bir antijenik ilişki söz

konusudur. Ayrıca, G35 izolesinin Ev ile ilişki oranlarına bakılırsa, diğer saha suşları ve referans D78'den biraz daha yüksek olduğu görülmektedir. D78 ve Ev arasında gözlenen 0.19 oranındaki R değeri A.B.D.'de yapılan çalışmadaki sonuç ile aynı bulunmuştur (12). Bu da çalışmamızda kullanılan teknik ve standartların kontrolü açısından değerli bir sonuçtur.

Bu çalışmada elde edilen bulgular ışığında, ülkemizdeki salgın viruslarının da Avrupa ve diğer ülkelerdeki çok virulent IBDV salgınlarında olduğu gibi (24, 29, 30, 32) A.B.D.'deki varyantlardan farklı, serotip 1 grubu klasik virusları tarafından meydana getirildiği sonucuna varılmıştır. Ancak, serotip 1 grubunda klasik viruslar arasında G35 gibi bir alt-tipin tesbit edilmesi sahada farklı daha pek çok antijenik alt-tipin bulunabileceğinin işareti olarak gözardı edilmemelidir. Bu tip farklılıkları yakalayabilmek için çalışmaların daha fazla sayıda virus ile tekrarlanarak yaygınlaştırılmasında ve izole edilen virusların monoklonal antikorlar kullanılarak incelenmesinde yarar vardır.

Antijenik farklı suşlar, özellikle A.B.D.'deki antijenik ve patojenik özellikleri bakımından çok farklı olan varyant suşları 1980'li yılların ortalarında sahada klasik aşı suşlarıyla yapılan aşılamalarda başarısızlıkların nedeni olarak görülmüştür (12, 33). Daha sonra varyant suşların aktif ve inaktif olarak aşılarla ilave edilmesiyle sorun çözülmeye çalışılmıştır. Ülkemizde de farklı antijenik subtipler var ise, bunların ortaya çıkarılması ve aşı virusu elde etme çalışmalarının başlatılması gerekir. Gumboro hastalığından korunma kompleks bir mücadele programıdır. Hijyen, izolasyon ve mevcut aşılarla aşılamalar yanında ülkenin kendi viruslarının özelliklerinin tanımlanması, daha etkili kontrol stratejileri oluşturmak, kullanılacak aşı ve programları ile ilgili karar verebilmek için büyük önem taşımaktadır.

Teşekkür

Bu projeyi destekleyen TÜBİTAK-Veteriner Hayvancılık Araştırma Grubuna ve Tarım ve Köyüleri Bakanlığı-Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğüne teşekkür ederiz. Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü Doku Kültürü ve Araştırma Laboratuvarlarında çalışan personele projenin yürütülmesi sırasında yardımlarından dolayı teşekkür ederiz. Referans virusları sağlayan Dr. Y. M. Saif'e, subklinik enfeksiyondan izole ettiği G35 suşunu çalışmamıza veren Dr. Aysel Ergün'e teşekkürü bir borç biliriz.

Kaynaklar

1. Allan, W.H., Faragher J.T., and Cullen G.A., Immunosuppression by the Infectious Bursal Agent in Chickens Immunized against New castle Disease, *Vet. Rec.*, 1972, 90: 511-512.
2. Cosgrove A.S., An apparently New Disease of Chickens-Avian Nephrosis, *Avian Dis.*, 1962, 6: 385-389.
3. Jackwood D.J., Saif Y.M., and Hughes J.H., Characteristics and Serologic Studies of Two Serotypes of Infectious Bursal Disease Virus in Turkey, *Avian Dis.*, 1982, 26: 871-882.
4. Lukert P.D., Jones S.M., Lee L.H., and Nusbaum K.E., Antigenic Variations of Several Strains of Infectious Bursal Disease Virus, *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 1981, 179: 269-270.
5. McFerran J.B., McNulty M.S., McCillop E., Corner T.J., McCracken R.M., Collins D.S., and Allan G., Isolation and Serological Studies with Infectious Bursal Disease Viruses From Fowl, Turkeys and Ducks, Demonstration of a Second Serotype, *Avian Pathology*, 1980, 9: 395-404.
6. Ismail N.M., Saif Y.M., Immunogenicity of Infectious Bursal Disease Viruses in Chickens, *Avian Dis.*, 1991, 35: 460-469.
7. Jackwood D.J., Saif Y.M., Moorhead P.D., Immunogenicity and Antigenicity of Infectious Bursal Disease Virus Serotype I and II in Chickens, *Avian Dis.*, 1985, 29: 1184-1194.
8. Mazariegos L.A., Lukert P.D., and Brown J., Pathogenicity and Immunosuppressive Properties of Infectious Bursal Disease "Intermediate" Strains, *Avian Dis.*, 1990, 34: 203-208.
9. Rosenberger J.K., and Cloud S.S., Isolation and Characterization of Variant Infectious Bursal Disease Viruses, 123rd Am. Vet. Med. Assoc. Meet. Abstr. no.181, 1985, p:357.
10. Snyder D.B., Savage P.K., Mengel S.A., Vakharia V.N., and Luttkick D., Molecular Epidemiology of Infectious Bursal Disease Virus in the United States, *Proc. Intl. Sym. on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia*, Rauschholzhausen, Germany, 1994, pp:65-70.
11. Saif Y.M., Jackwood D.H., and Jackwood D.J., and M.W., Relatedness of IBD Vaccine Strains and Field Strains, *Proceedings of the 36th Western Poultry Disease Conference*, Davis, CA, 1987, pp: 110-111.
12. Jackwood D.H., and Saif Y.M., Antigenic Diversity of Infectious Bursal Disease Viruses, *Avian Dis.*, 1987, 31: 766-770.
13. Ismail N.M., Saif Y.M., Wigle W.L., Havenstein G.B., and Jackson C., Infectious Bursal Disease Variant from Commercial Leghorn Pullets, *Avian Dis.*, 1990, 34: 141-145.
14. Rosenberger J.K., Cloud S.S., and Metz A., Use of Infectious Bursal Disease Virus Variants in Broilers and Broiler Breeders, *Proceedings of the 36th Western Poultry Disease Conference*, Davis, CA, 1987, pp: 105-109.
15. Lukert P.D., Mazariegos L.A., and Craft D.W., Antigenic, Biologic and Immunosuppressive Comparisons of Standard and Variant Strains of Infectious Bursal Disease Virus. *Proc. 127th AVMA Meet.*, San Antonio, TX, 1990, p.105.
16. Chettle N.J., Stuart J.C., and Wyeth P.J., Outbreak of Virulent Infectious Bursal Disease in East Anglia, *Vet. Rec.*, 1989, 125: 271-272.
17. Çöven F., Broyler ve Yumurtacı Tavuklarda Gumboro (Infectious Bursal Disease) Hastalığının İnsidensi ve Virus İzolasyonu, *Doktora Tezi*, 1995, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi.
18. Drouin P., Toux J.Y., Picault J.P., Etteradossi N., Guittet M., and Bennejean G., Epidemiology of Infectious Bursal Disease in France, *Proc. of Intl. Sym. on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia*, Rauschholzhausen, Germany, 1994, pp: 215-228.
19. Du Perez J.H., Control of wIBD in South Africa, *World Poultry Misset, Special Issue on Gumboro*, 1994, pp: 17-18.
20. Lasher H.N., IBD Prevention and Control in Asia, *World Poultry Misset, Special Issue on Gumboro*, 1994, pp: 26-29.
21. Mohiuddin S.M., Infectious Bursal Disease in India, *Poultry International*, July, 1994, pp: 56-57.
22. Nunoya T., Otaki Y., Tajima M., Hiraga M., and Saito T., Occurrence of Acute Infectious Bursal Disease with High Mortality in Japan and Pathogenicity of Field Isolates in specific-Pathogen-Free Chicken, *Avian Dis.*, 1992, 36: 597-609.
23. Tsai H.J., Lu Y.S., Epidemiology of Infectious Bursal Disease in 1992, *J. of the Chinese Socie. of Vet. Science*, 1993, 19: 249-258.
24. Van den Berg T.P., Gonze M., Muelemans G., Acute Infectious Bursal Disease Virus *Proc. of Intl. Sym. on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia*, Rauschholzhausen, Germany, 1994, pp: 54-64.
25. Türe O., Dünyada ve Türkiye'de Gumboro Hastalığı-Bir Değerlendirme, *Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü Yayını*, 1994, No:7.
26. Türe O., Çöven F., Türkiye'deki İnfeksiyöz Bursal Hastalığı Salgınlarından Çok Virulent Virusların İzolasyonu ve Serotiplendirilmesi, *Turkish J. Vet. and Animal Sci.*, dergisinde yayınlanmak üzere kabul edildi).
27. Ergün A., Klinik ve Subklinik Gumboro Vakalarından Virus İzolasyonu ve Serotiplendirilmesi, *Doktora Tezi*, 1995, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi.
28. Brown M., Green P., and Skinner A., VP2 Sequences of Recent European "Very Virulent" Isolates of infectious Bursal Disease Virus are Closely Related to Each Other but are Distinct From Those of "Classical" Strains, *J. of Gen. Virology*, 1994, 75: 675-680.

29. Eterradossi N., Picault J.P., Drouin P., Guitet M., L'Hospitalier R., Bennejean G., Pathogenicity and Preliminary Antigenic Characterization of Six Infectious Bursal Disease Virus Strains Isolated in France from Acute Outbreaks, *J. of Veterinary Medicine, Series B*, 1992, 39: 683-691.
30. Lutticken D., Cornelissen D.R.W., Posthumus W.P.A., Vries M.de., Thijssen R., Cross Protection Studies in Chickens Involving Different Bursal Disease Subtypes, *Proceedings of XIX World's Poultry Congress, Amsterdam*, 1992, pp: 456-460.
31. Nakamura T., Lin Z., Tokuda T., Kato A., Otaki Y., Nunoya T., and Ueda S., Japanese IBDV's and Diagnosis, *Proc. Intl. Sym. on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia, Rauschholzhausen, Germany*, 1994, pp: 162-170.
32. Singh K.C.P., Dhawekar R.G., Serological Characterization of Local Strains of Infectious Bursal Disease Virus and Their Antigenic Relation with Vaccine Virus, *Indian Journal of Virology*, 1993, 9: 120-124.
33. Snyder D.B., Changes in the Field Status of Infectious Bursal Disease Virus, *Avian Pathology*, 1990, 19: 419-423.
34. Türe O., Çöven F., Türkiye'de İzole Edilen Enfeksiyöz Bursal Hastalığı Viruslarının Virus Nötralizasyon Testi ile Serotiplendirilmesi ve Antijenik Alt-Grupların Belirlenmesi, *U.Ü., Vet. Fakültesi, Marmara Böl. II Hayvancılık Kongresi, Bursa*, 1995, p: 71.
35. Van den Berg T.P., Morales D., Gonze M., and Muelemans G., Relevance of Antigenic Variation for Protection in Infectious Bursal Disease, *Proc. Intl. Sym. on Infectious Bursal Dis. and Chicken Infectious Anemia, Rauschholzhausen, Germany*, 1994, pp: 22-36.
36. Van den Marel P., Synder D., Lutticken D., Antigenic Characterization of Field Isolates by Their reactivity with a Panel of Monoclonal Antibodies, *Dtsch. Tierarztl. Wschr.*, 1990, 97: 81-83.
37. Reed L.J., and Muench H., Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints, *The American Journal of Hygiene*, 1937, 27: 493-497.
38. Archetti I., and Horsfall., Persistent Antigenic Variation of Influenza A Viruses After Complete Neutralization in Ovo with Heterologous Immune Serum, *J. Exp. Med.*, 1950, 92: 441-462.
39. Sivanandan V., Limeumpao J.A., Benson H.J., and Newman J.A., Serologic Evidence of Infectious Bursal Disease Virus Serotype II Infection in Minnesota Turkeys, *Avian Dis.*, 1984, 28: 765-769.
40. Ismail N.M., Saif Y.M., Lack of Pathogenicity of Five Serotype 2 Infectious Bursal Disease Viruses in Chickens, *Avian Dis.*, 1988, 32: 757-759.
41. Jackwood D.J., Saif Y.M., Moorehead P.D., and Bishop G., Failure of Two Serotype II Infectious Bursal Disease Viruses to Affect the Humoral Immune Response of Turkeys, *Avian Dis.*, 1984, 28: 100-116.
42. Snyder D.B., Lana D.P., Cho B.R., and Marquardt W.W., Group and Strain Specific Neutralization Sites of Infectious Bursal Disease Viruses Directly From Infected Tissues with Neutralizing Monoclonal Antibodies: Evidence of a Major Antigenic Shift in Recent Field Isolates, *Avian Dis.*, 1989, 32: 535-539.