

Türkiye'de İzole Edilen İnfeksiyöz Bursal Hastalığı Viruslarının Nükleik Asitlerinin SDS-Page Tekniği ile İncelenmesi

Olca TÜRE

Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü 35010 Bornova, İzmir-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 10.03.1997

Özet : Türkiye'de 1990'lı yıllarda tavuklarda meydana gelen infeksiyöz bursal hastalığı (IBD) salgınlarından izole edilen infeksiyöz bursal hastalığı viruslarının (Marmara:G3,G12,G41; Ege: G34,G35; İç Anadolu: ETL3) nükleik asit yapıları serotip 1 grubu D78 suşu ile karşılaştırmalı olarak SDS-PAGE tekniği ile incelendi.

Gümüş nitrat ile boyanan jelde, saha virusları referans suşa benzer şekilde çift segmentli RNA yapısı gösterdi ve test edilen viruslar arasında RNA segmentlerinin göç uzaklıkları yönünden bir farklılık saptanmadı. Daha önce virus nötralizasyon (VN) testi ile karakterize edilmemiş olan G12 kod'lu saha izolesi bu çalışmadaki diğer viruslar gibi çift segmentli RNA yapısı gösterdi ve IBD virusu olduğu kesinleşti.

Anahtar Sözcükler : IBDV, Nükleik Asitler, SDS-PAGE.

Examination of Nucleic Acids of Infectious Bursal Disease Viruses Isolated in Turkey

Abstract : Nucleic acids of infectious bursal disease viruses (IBDV), (Marmara:G3,G12,G41; Aegean: G34,G35; Central Anatolia: ETL3) isolated from the infectious bursal disease (IBD) outbreaks occurred in chickens during 1990's in Turkey were examined and compared with those of serotype 1 D78 strain using the SDS-PAGE technique.

Six field viruses showed two segmented RNA structure similar to the reference strain in silver nitrate stained gel and no differences were detected in the migration distances of the RNA segments among the viruses tested. The field isolate designated G12 that was not characterized before by virus neutralization (VN) test showed two segmented RNA pattern similar to the other viruses in this study and was identified as an IBDV.

Key Words : IBDV, Nucleic Acids, SDS-PAGE.

Giriş

İnfeksiyöz bursal hastalığı virusu (IBDV) genç piliçleri etkileyen immunosupresif bir hastalığın (Gumboro Hastalığı) etiyolojik etkenidir (1). IBDV, Birnaviridae familyasında yer alır ve 58-60 nm çapında zarfsız-ikozahedral bir simetriye sahiptir (2,3). Cesium chloride'taki (CsCl) buoyant densitesi 1.32g/ml'dir (4). Genomu çift sarmallı, çift segmentli RNA (dsRNA) yapısında olup, iki segmentin moleküler ağırlıkları 2.2×10^6 ve 2.5×10^6 olarak bulunmuştur (5,6). Büyük segment (A) yaklaşık 3400 baz çifti (base pairs/bp) uzunluğunda, küçük segment (B) ise yaklaşık 2900 bp uzunluğundadır (7,8). A segmenti, virus replikasyonu sırasında 110K moleküler ağırlığındaki poliproteine dönüşen open-reading-frame'i (ORF) içerir (7). Bu prekürsör (ön ayrışma ürünü) poliprotein daha sonra olgun virus proteinlerini oluşturmak üzere, VP2 (40K),

VP4 (28K) ve VP3 (32K) olarak, aynı sıra ile 3 viral yapı proteinine proteolitik olarak parçalanır (7). Ayrıca 48K moleküler ağırlıkta VPX adı verilen, VP2'nin prekürsörü olan bir başka protein gösterilmiştir (3). VPX, replikasyon sırasında olgunlaşmasını tamamlayamamış viruslarda (incomplete/defective/interfering particles) daha sık görülen bir proteindir (9). B segmenti 90K moleküler ağırlıktaki VP1 proteinini kodlar (8).

IBDV'nin serotip 1 ve 2 olmak üzere iki serotipi mevcuttur (10,11). Daha önce yapılan çalışmalarda IBDV serotip 1 ve 2 grubu viruslarının proteinlerinin göç uzaklıkları açısından belirgin farklılıklar olduğu ortaya konmuştur (12,13,14). Aynı şekilde IBDV'nin serotip 1 ve 2 grubu suşlarıyla yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda bu iki serotipteki virusların nükleik asitlerinin 30 saat veya daha fazla sürede ko-elektroforez işlemine tabi tutulduğunda farklı uzaklıklarda göç ettikleri gözlenmiştir

* Bu rapor, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı desteğiyle yürütülen TAGEM-HSA-07-23 kodlu projeden hazırlanmıştır.

(13). Bu farklılıklar nedeniyle, çok hassas olan VN testleri yanında SDS-PAGE tekniğinin de serotiplerin ayırılabilmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir (13).

Bu çalışmada, ülkemizde izole edilen IBD viruslarının nükleik asitlerinin bilinen serotip 1 grubu virusu ile karşılaştırılarak SDS-PAGE tekniğiyle moleküler düzeyde karakterizasyonu amaçlanmaktadır.

Materyal ve Metot

Viruslar: Referans virus olarak Dr.Y.M.Saif'ten (Food Animal Health Research Program, OARDC, Wooster, OH) sağlanan civciv embriyo fibroblast (CEF) hücrelerine adapte serotip 1 grubu D78 suşu kullanıldı. Bu çalışmada yer alan saha virusları daha önceki çalışmalarda CEF hücrelerine adapte edilen ve G12 suşu hariç diğerleri VN testi ile karakterize edilen suşlardı (15,16). G3, G12 ve G41 Marmara Bölgesi, G34 ve G35 Ege Bölgesi, ETL3 İç Anadolu Bölgesindeki infeksiyöz bursal hastalığı salgınlarından izole edilmiştir (15).

Spesifik-Patojen-Free (SPF) Yumurta: CEF hücrelerinin üretiminde kullanılan SPF yumurtalar Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü SPF sürülerinden sağlandı.

Hücre Kültürü: Virusların çoğaltılmasında 10 günlük embriyolu SPF yumurtalardan daha önce açıklanan yöntemle göre hazırlanan CEF hücre kültürleri kullanıldı (15).

Virusların Saflaştırılması: IBD referans ve saha virusları referans yöntemde yapılan bazı değişikliklerle aşağıda açıklandığı şekilde saflaştırıldı (14). Viruslar, her biri yaklaşık 1 lt miktarındaki hücre kültürü sıvısından Beckman Type 21 rotor ile (Beckman Instruments Inc., Fullerton CA, USA) 18.000 rpm'de 4°C'de 4.5 saat santrifüj edilerek konsantre edildi. Virus peleti TNE buffer (0.01M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.001M EDTA, pH 7.9) ile toplandı, viruslar dondurulup çözdürüldükten sonra pelet MSE-Soniprep 150 ultrasonik parçalayıcıda (Fisons Instrumentation Services, Sussex, İngiltere) sonikasyonla parçalandı. Daha sonra eşit miktarda freon (1, 1,2-Trichlorotrifluorethan, Merck) ile muamele edilerek 5 dakika süreyle vorteks ile karıştırıldı ve 2500 rpm'de 30 dakika 4°C'de santrifüj edildi. Üst fazdaki virus içeren sıvı alındı ve %30'luk sukroz çözeltisi (w/v) üzerine yerleştirilerek Beckman SW40Ti swinging bucket rotor kullanılarak 26.000rpm'de 4°C'de 3 saat santrifüj edildi.

Pelet TNE buffer ile süspanse edildikten sonra yukarıdaki gibi sonikasyona tabi tutuldu ve santrifüj edildi. Bu virus örneği 3'lü CsCl-Sukroz gradientleri üzerine konarak Beckman şeffaf (ultraclear) tüplerde (14x95mm) SW40Ti swinging bucket rotorda 4°C'de 3 saat 26.000 rpm'de santrifüj edildi. Üçlü gradient solusyonları, CsCl ile 1.40g/ml ve 1.30g/ml ve sukroz ile %20 (w/v) konsantrasyonlarda TNE buffer içinde hazırlandı. Gradientler yoğun densiteden başlamak üzere, her solusyondan 3 ml ve tüpün en üst kısmına kısmi saflaştırılmış virus örneği konarak oluşturuldu. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra tüpler karanlık bir odada üstten ışık kaynağı ile aydınlatılarak iki CsCl tabakası arasındaki bölgede mavi gri renkli virus bandı gözlemlendi. Tüpün yanından ve virus bandının tam alt kısmından insülin tip enjektör iğnesiyle delinerek band enjektöre toplandı ve virus Servapor dializ tüpüne (Serva, Feinbiochemica GmbH Co., Almanya) konarak 4°C'de TNE buffer aralıklı olarak değiştirilmek suretiyle 4-6 saat süreyle dializ edilerek CsCl uzaklaştırıldı. Son aşamada, dializ edilen virus %20 sukroz çözeltisi (w/v) üzerinden 3 saat, 4°C de, SW40Ti rotorda 26.000 rpm'de santrifüj edilerek konsantre edildi. Pelet, %0.5 SDS içeren 400-500ul TNE buffer ile toplandı ve RNA ekstraksiyonu yapılmak üzere -20°C de saklandı.

Viral RNA'nın Ekstrakte Edilmesi: Referans ve saha viruslarının genomik RNA'leri Müller ve ark.'larının modifiye edilmiş tekniği ile ekstrakte edildi (6). Saflaştırılmış virus örneklerine 2.0mg/ml final konsantrasyonda Proteinase K (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) ilave edilerek 37°C 'de 1 saat inkube edildi ve viral RNA'nın serbest kalması sağlandı. RNA örnekleri eşit miktardaki fenol: kloroform: isoamyl alkol (25:24:1) ile karıştırıldıktan sonra 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Üstteki viral RNA içeren sıvı alındı, buna 2 kısım soğuk etanol ilave edilerek karıştırıldı ve bir gece -20°C de bekletildi. Presipite olmuş RNA santrifüj edilerek çöktürüldü ve sample buffer (%75 sukroz + %5 bromfenol mavisini) ile süspanse edilerek SDS-PAGE için hazırlandı.

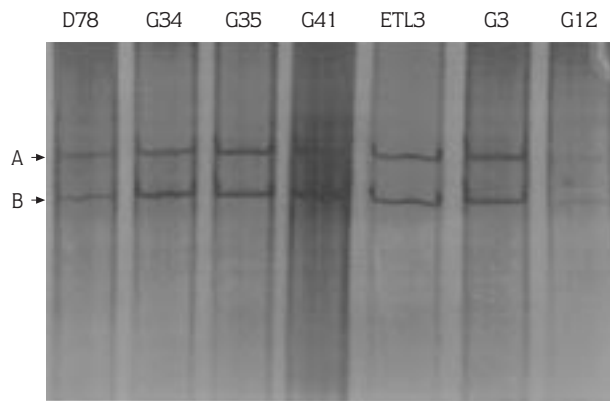
SDS-PAGE: IBD viruslarının nükleik asitleri Laemmli'nin (17) aralıklı (discontinuous) SDS-PAGE sistemi kullanılarak, %3.5 yığıcı, %7.5 ayırıcı jelde ayrıştırıldı. Elektroforez işlemi Hoefer marka slab jel ünitesi (SE-600 Dual Cooled Vertical Slab Gel Electrophoresis Unit, Hoefer Sci. Inc., San Francisco,CA) kullanıldı. Ünitenin alt ve üst buffer tankları elektrod

buffer (0.025M Tris, pH 8.3, 0.192M Glisin ve %0.1 SDS) ile doldurulduktan sonra jelde oluşturulmuş gözlemlere, 50ul saf RNA örneğine 5 ul sample buffer katılarak hazırlanan RNA örnekleri yüklendi. Elektroferez işlemi Hoefer'in PS 500XT güç ünitesine bağlı olarak 50 V'luk sabit voltaj ile oda ısısında 30 saatte gerçekleştirildi. İşlem sırasında sistem akar suya bağlanarak soğutuldu.

Gümüş Nitrat (AgNO₃) Boyama: SDS-PAGE'te göç eden nükleik asitler, Herring ve ark.'larının (18) uyguladığı Gümüş Nitrat Boyama tekniği ile kısaca aşağıda açıklandığı şekilde boyanarak gözlemlendi (29). Jel %10 etanol-%0.5 asetik asit solusyonu içinde bir gece tutularak SDS'ten arındırıldı. 0.011M konsantrasyonda taze olarak hazırlanan AgNO₃ ile 2 saat sürede hareketli platform üzerinde hafifçe çalkalanmak suretiyle boyandı ve sonra jel distile su ile 2-3 dakika yıkandı. Yine taze olarak hazırlanan 0.75M NaOH, 0.1M formaldehit ve 0.0023M sodyum borohidrat içeren redükleyici solusyonu içinde çalkalamak suretiyle muamele edildi. Kahverengi RNA bantları yeteri kadar koyulukta ortaya çıkınca (maksimum 10 dakika) redükleyici solusyon uzaklaştırıldı ve reaksiyon %5 oranındaki asetik asit ile durduruldu. Jel aynı solusyon içinde korundu ve fotoğrafı çekildi.

Bulgular

IBDV Nükleik Asitlerin Teşhisi ve Karşılaştırılması: Referens ve saha viruslarının RNA'larının SDS-PAGE analiz sonucu Şekil 1'de gösterilmiştir. Bu çalışmada, incelenen tüm virüslerde IBDV'ye ait çift segmentli nükleik asit



Şekil 1. Türkiye IBD virüsleri (G34, G35, G41, ETL3, G3 ve G12) ve serotip 1 grubunu temsilen referans D78 suşunun segmentli RNA'larının karşılaştırmalı sonucu. RNA'lar poliakrilamid jelde 30 saat süreyle elektroferez edilmiş ve jel gümüş nitrat ile boyanmıştır. A ve B segmenti sol tarafta oklarla işaretlenmiştir.

gözlemlendi. Üstteki RNA bandı, 2.5×10^6 moleküler ağırlıktaki A segmentinin, alt kısımdaki band (2.2×10^6) daha hafif moleküler ağırlıktaki B segmentinin karşılığıdır. Bu incelemede, serotip 1 grubu D78 suşu ile çeşitli coğrafik bölgeleri temsil eden saha virüsleri (G3, G12, G34, G35, G41, ETL3) arasında RNA bantlarının göç uzaklıkları açısından 30 saat süren elektroferez sonucunda bir farklılık gözlemlenmedi. Diğer saha virüslerinden farklı olarak, bu çalışma öncesinde serotip grubu henüz karakterize edilmemiş olan Marmara bölgesine ait G12 suşunun nükleik asit analizinde diğerlerine göre, ince bantlar şeklinde olmakla beraber iki segmentli RNA gözlemlendi ve bu virüsün de IBDV olduğu kesinleşti.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, 1990'lı yıllarda Avrupa, Orta Doğu, Afrika ve Uzak Doğu ülkelerinde olduğu gibi (19, 20, 21, 22, 23, 24, 25), Türkiye tavukçuluk endüstrisinde de (26,27) büyük ekonomik zararlara neden olan çok bulaşıcı, akut, ölümcül infeksiyöz bursal hastalığı salgınlarından izole edilen virüslerin nükleik asitlerinin SDS-PAGE ile analiz sonuçları rapor edilmektedir.

VN, SDS-PAGE ve Western immunoblotting gibi çeşitli tekniklerden biri ile daha önceden karakterize edilmiş olan G3, G34, G35, G41, ETL3 suşları (15,16,28) nükleik asitlerinin incelenmesinde amaç, ülkemize ait olan IBD virüslerinin serotipleri ve antijenik yapıları yanında genomik yapıları hakkında da bilgi sahibi olmak ve bu virüslerin moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmektir.

IBDV'nin çift segmentli, çift sarmallı RNA içeren bir virus olduğu pek çok çalışmada ortaya konmuştur (3, 6, 13). Pürifiye edilmiş Türkiye saha virüslerinin nükleik asitlerinin serotip 1 grubu ile karşılaştırıldığı bu çalışmada da (Şekil 1.), tüm virüslerin genomik RNA'larının çift segmentli olduğu görülmüş ve virüslerin RNA segmentlerinin göç uzaklıkları arasında herhangi bir fark görülmemiştir. Bu bulgu, serotip 1 grubu virüsleri için literatürlerde belirtilen sonuçlara benzer bulunmuştur (13, 29). Bununla beraber, serotip 1 ve 2 grubu virüsleri RNA göç paternlerine göre birbirinden ayrılabilirlerdir (13). Bir çalışmada, serotip 1 ve 2 grubu virüsleri 30 saat veya daha uzun süre ko-elektroferez işlemine tabi tutulduğunda, diğer bir deyişle serotip 1 ve 2 grubu virüsü jelde aynı gözde beraber

elektroforez edildiğinde, serotip 2 grubu virusunun segmentlerinin farklı uzaklıklarda göç ettiği gözlenmiş ve SDS-PAGE tekniğinin serotiplerin birbirinden ayırımında kullanılabileceği bildirilmiştir (13). Bu proje planlanırken serotip 1 virusu yanında serotip 2 virusu ile de karşılaştırmalı çalışma öngörülmüş, ancak serotip 2 grubu OH virusunun CEF'te düşük titrelerde çoğaltılabilmesi ve saflaştırma sırasındaki kayıplar nedeniyle yeteri miktarda RNA elde edilemediğinden sonuçlar şimdilik bu kadarıyla rapor edilebilmiştir. Gelecekte OH virusunu da içeren bir başka çalışma ile bu eksiklik tamamlanacaktır.

Bu çalışmadaki G12 kod'lu saha suşu önceden tam karakterize edilmemiş olması nedeniyle diğerlerinden ayrı tutulmuştur. G12 suşu bir broyler sürüsünden izole edilmiş, agar jel presipitasyon (AGP) testi ile IBDV olduğu belirlenmiş ve CEF hücrelerine adapte edilmiş bir virustur. Kalitatif olarak gerçekleştirilen ön VN denemelerinde, hücre kültürü adapte virus yüksek dozda antiserum ile inkübe edildikten sonra hücreye inokule edildiğinde nötralize olmasına rağmen, kantitatif testlerde nötralize olmamıştır (15). Bu gözlem nedeniyle G12 suşu daha ayrıntılı üzerinde çalışılmak üzere önceki çalışmalardan ayrılmıştır. Bu çalışmada G12 suşunun nükleik asitleri incelendiğinde bir IBD virusu olduğu

görülmüş, ve RNA'sı diğer serotip 1 grubu suşları ile aynı uzaklıklarda göç ettiği için, serotip 1 grubunda klasifiye edilmiştir. Nükleik asit yapısına göre serotiplendirilmesi yanında bundan sonraki çalışmalarda bu suşun antijenik yapısının ortaya konması ile ülkemize ait identifiye edilmiş IBD virus kaynağına bir yenisi eklenmiş olacaktır.

Bugün araştırma alanında mevcut olan testler arasında VN testi IBD viruslarının serotiplendirilmesi ve antijenik özelliklerinin belirlenmesi için hala en etkili test olma özelliğini korumaktadır. Son zamanlarda, Reverse Transcriptase/Polymerase Chain Reaction-Restriction Endonuclease (RT/PCR-RE) veya RT/PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) olarak isimlendirilen, serotip 1 ve 2 grubu virusların veya serotip 1 grubu içindeki subtiplerin birbirinden ayrılmasına yarayan moleküler teknikler geliştirilmiştir (30,31,32,33,34). Virusların izolasyonu, hücreye adaptasyonu gibi işlemler için zaman gerektirmeyen, virusların özelliklerini 2-3 gün gibi kısa bir sürede tanımlamaya yarayan bu gibi moleküler tekniklerin ülkemizdeki virusların incelenmesi ve kanatlı endüstrisinin problemlerine yardımcı olunabilmesi amacıyla kullanılması hedef ve dileğimizdir.

Kaynaklar

1. Hirai K., Kunihiro K., and Shimakura S., Characterization of Immunosuppression in Chickens by Infectious Bursal Disease Virus, *Avian Dis.*, 1979, 24:950-965.
2. Brown F., The Classification and Nomenclature of Viruses: Summary of Results of Meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai, September 1984. *Intervirology*, 1986, 25: 141-143.
3. Dobos P., Hill B.J., Hallet R., Kells D.T.C., Becht H., and Teninges D., Biophysical and Biochemical Characterization of Five Animal Viruses with Bi-segmented Double-Stranded RNA Genomes, *J.Virol.*,1979, 32: 593-605.
4. Todd D., and McNulty M.S., Biochemical Studies with Infectious Bursal Disease Virus: Comparison of Some of Its Properties with Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Arch. of Virol.*, 1979, 60:265-277.
5. Dobos P., Peptide Map Comparison of the Proteins of Infectious Bursal Disease Virus, *J.Virol.*,1979, 32: 1046-1050.
6. Müller H., Scholtissek C., and Becht H., The Genome of Infectious Bursal Disease Virus Consists of Two Segments of Double Stranded RNA, *J.Virol.*,1979, 31: 584-589.
7. Hudson P.J., McKern N.M., Power B.E., and Azad A.A., Genomic Structure of the Large RNA Segment of Infectious Bursal Disease Virus, *Nucl.Acids Res.*, 1986, 14: 5001-5012.
8. Morgan M.M., Macreadie I.G., Harley V.R., Hudson P.J., and Azad A.A., Sequence of the Small Double-Stranded RNA Genomic Segment of Infectious Bursal Disease Virus and Its Deduced 90kDa Product, *Virol.*, 1988, 163:240-242.
9. Müller H., and Becht H., Biosynthesis of Virus-Specific Proteins Infected with Infectious Bursal Disease Virus and Their Significance as Structural Elements for Infectious Virus and Incomplete Particles, *J.of.Virol.*, 1982, 44:384-392.
10. 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.
11. McFerran J.B., McNulty M.S., McCillip 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 Pathol.*1980, 9: 395-404.
12. Becht H., Müller H., and Müller H., Comparative Studies on Structural and antigenic Properties of Two serotypes of Infectious Bursal Disease, *J.Gen.Virol.*,1988, 69:631-640.

13. Jackwood D.J., Saif Y.M., and Hughes J.H., Nucleic Acid Structural Proteins of Infectious Bursal Disease Virus Isolates Belonging to Serotype I and II, *Avian Dis.*, 1984,28: 990-1006.
14. Türe O., and Saif Y.M., Structural Proteins of Classic and Variant Strains of Infectious Bursal Disease Viruses, *Avian Dis.*, 1992, 36: 829-836.
15. Türe O., ve Çöven F., Türkiye'deki İnfeksiyöz Bursal Hastalığı Salgınlarından Çok Virulent Suşların İzolasyonu ve Serotiplendirilmesi, (TÜBİTAK J.of Vet.and Anim. Sci.'da yayınlanmak üzere kabul edildi.).
16. Türe O., Çöven F., ve İçin S., Türkiye'de Çeşitli Bölgelerden İzole Edilen Çok Virulent İnfeksiyöz Bursal Hastalığı Viruslarının Antijenik Benzerlikleri, *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences* 1993, 23:69-76.
17. Laemmli U.K., Cleavage of Structural Proteins During the assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 1970, 227:680-685.
18. Herring A.J., Inglis N.I., Ojeh C.K., Snodgrass D.R., and Menzies J.D., Rapid Diagnosis of Rotavirus Infection by Direct Detection of Viral Nucleic Acid in Silver Stained Polyacrylamide Gels, *J.Clin.Microb.*, 1982, 16:473-477.
19. 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.
20. Du Perez J.H., Control of vIBD in South Africa, *World Poultry Misset*, Special Issue on Gumboro, 1994, pp:17-18.
21. Etteradossi 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.
22. Lasher H.N., IBD Prevention and Control in Asia, *World Poultry Misset*, Special Issue on Gumboro, 1994, pp:26-29.
23. 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 Chickens, *Avian Dis.*, 1992, 36: 597-609.
24. Tsai H.J., Lu Y.S., Epidemiology of Infectious Bursal Disease in Taiwan in 1992., *J.of the Chinese Socie.of Vet.Science*, 1993, 19: 249-258.
25. Van den Berg T.P., Gonze M., Muelemans G., Acute Infectious Bursal Disease in Poultry: Isolation and Characterization of a Highly Virulent Strain, *Avian Pathol.*, 1991, 20:133-143.
26. Çöven F., Broyler ve Yumurtacı Tavuklarda Gumboro (Infectious Bursal Disease) Hastalığının İnsidensi ve Virus İzolasyonu, Doktora Tezi, 1995, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Bursa.
27. Ergün A. Klinik ve Subklinik Gumboro Vakalarından Virus İzolasyonu ve Serotiplendirilmesi, Doktora Tezi, 1995, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Konya.
28. Türe O., ve Çöven F., SDS-PAGE ve Western İmmunoblotting Teknikleri Kullanarak Türkiye'de İzole Edilen Çok Virulent İnfeksiyöz Bursal Hastalığı Viruslarının Proteinlerinin Karşılaştırmalı Analizi, *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences* 1999, 23: 83-92.
29. Wang H.R., Lee L.H., Shieh H.K., Comparative Analysis of the Capsid Protein and Nucleic Acid of Infectious Bursal Disease Viruses Isolated in Taiwan, *Taiwan J.of Vet.Med. and Anim.Husbandary*, 1990, 56:93-103.
30. Jackwood D.J., and Jackwood R.J., Infectious Bursal Disease Viruses: Molecular Differentiation of Antigenic Subtypes Among Serotype 1 Viruses, *Avian Dis.*, 1994, 38:531-537.
31. Jackwood D.J., and Jackwood R.J., Molecular Identification of Infectious Bursal Disease Virus Strains, *Avian Dis.*,1997, 41:64-71.
32. Jackwood D.J., and Nielsen C.K., Diagnosis of Infectious Bursal Disease Viruses in Commercially Reared Chickens Using the Reverse Transcriptase/Polymerase Chain Reaction-Restriction Endonuclease Assay, *Avian Dis.*, 1997, 41:99-105.
33. Giambone J.J., Liu H.J., and Dormitorio T., genetic Variations in Infectious Bursal Disease Virus Using Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequence Comparisons of Polymerase Chain Reaction Generated cDNA, *Proc.Intl.Sym.on Infec.Bursal Dis.*, and *Chicken Inf. Anemia*, Rauschholzhausen, Germany, 1994, pp:71-82.
34. 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.