تنميط فيروس مرض التهاب الجراب المعدي باستعمال اختبار الاليزا اللاقطة للأضداد وحيدة النسيلة

Identification of Infection Bursal Disease Virus Using Antigen – Capture ELISA with Monoclonal Antibodies (Mabs)

Received 26 April 2009 / Accepted 10 February 2011

د. خالد حبو[1]، د. أنور العمر [2] و أ.د. محمد فاضل [3]

(1): كلية الطب البيطري – جامعة البعث – سورية.

(2): قسم الأحياء الدقيقة – كلية الطب البيطري – جامعة البعث – سورية.

(3): قسم أمراض الحيوان – كلية الطب البيطري – جامعة البعث – سورية.

المُلخَّص

يُعدُّ التهاب الجراب المعدي Infectious bursal disease (IBD) مرضاً فيروسياً حاداً يصيب الدجاج الفتي، ويُحدث ضرراً كبيراً في جراب فابريشيوس إضافة إلى تثبيط مناعتها ونسبة نفوق مختلفة.

جُمعت أجربة فابريشيوس من 35 قطيعاً من دجاج اللحم مصابةً بالتهاب الجراب المعدي خلال الفترة بين عامي 2006 و 2008 من ثلاث مناطق في الجمهورية العربية السورية (المنطقة الشمالية و الوسطى، و الجنوبية)، بهدف الكشف عن فيروس الجامبورو وتحديد العترة المعزولة ودراسة معدل الإصابة والنفوق.

أوضحت الدراسة بأنّ معدل الإصابة بهذا المرض تتراوح بين 6 و 70 %، في حين تراوح معدل النفوق بين1 و40 % في القطعان المصابة. ووُجد أنّ معدل حدوث المرض كان أعلى في الطيور التي تراوحت أعمارها بين 18و 37 يوماً، في حين لوحظت إصابات قليلة بعمر أكبر من 40 يوماً. وتمت زراعة وإكثار فيروس الجامبورو باستعمال طريقة الحقن على الغشاء المشيمي اللقانقي لأجنة بيض دجاج خالٍ من العوامل الممرضة النوعية (SPF)، وتم كشف وتنميط فيروس مرض الجامبورو في معلق جراب فابريشيوس باختبار الاليزا اللاقطة (Capture Elisa)، وذلك باستعمال أربعة أنماط من الأضداد وحيدة النسيلة (Monoclonal antibodies) ومقارنتها مع العترة الكلاسيكية (Classic strain) والعترات المتغايرة (Variant strainsو E / Del وGLS و RS593) . بينت النتائج أنّ 29 عينة من العزلات كانت تنتمي إلى نمط العترة الكلاسيكية.

يُستنتج من هذه الدراسة بأن الإصابات بمرض الجامبورو في سورية يسببها فيروس الجامبورو من نمط العترة الكلاسيكية.

الكلمات المفتاحية: مرض الجامبورو، فيروسات، دواجن سورية.

©2012 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved.

Abstract

Bursae of Fabricius were collected from 35 broiler flocks naturally infected with infectious bursal disease (IBD) in three areas of Syria (north, middle, south) during the period from 2006 to 2008. The aim was to detect the presence of the virus, identify virus strain and to study morbidity and mortality rates. The study revealed that the morbidity rate ranged between 6 to 70% and the mortality rate ranged between 1 to 40%. The infection rate was higher in chickens aged 18-37 days and lower in chickens aged 40 days and more. The IBD virus was isolated and propagated by inoculation on the chorioallantoic membrane (CAM) of specific pathogen free (SPF) chicken embryos. The viruses in bursae of Fabricius supernatant were screened and typed by Capture- ELISA using four monoclonal antibodies and compared with classic and variant strains (E/Del,GLS,RS593). Results showed that twenty nine of isolates were of the classical form.

Keywords: Infection Bursal disease, Virus, Poultry, Syria.

المقدمة

تُشكل تربية الدواجن جانباً أساسياً من جوانب الثروة الحيوانية، وقد شهدت سورية تطوراً واضحاً في تربية الدواجن خلال السنوات الأخيرة. تتميز صناعة الدواجن بأهمية اقتصادية عالية بالمقارنة مع بقية قطاعات الإنتاج الحيواني، بسبب سرعة دورة الإنتاج، وارتفاع نسبة تصافي اللحم، حيث تصل إلى قرابة 70-73 %، وتُعد مصدراً غنياً ورخيصاً للبروتين الحيواني (الغادري، 1986)، وتتعرض صناعة الدواجن في أنحاء الوطن العربي كافةً إلى مشاكل عديدة وخسائر اقتصادية كبيرة بسبب الإصابة بالأمراض، ومن أهمها مرض الجامبورو.

يُعدُّ التهاب الجراب المعدي (IBD) مرضاً فيروسياً حاداً (Chettle وزملاؤه، 1989؛ OIE، 2004 ؛ Gai و زملاؤه، 2005 ؛ Patricia وزملاؤه، 2006)، يصيب الدجاج لاسيما الطيور الفتية بعمر 3 - 6 أسابيع (Dormitorio، 2007 ؛ Pedro وزملاؤه، 2008)، في حين لا تُبدي الطيور أية أعراض إكلينيكية عند حدوث الإصابة بعمر أقل من أسبوعين، ولكن يؤدي إلى تثبيط المناعة (Immuno suppression) (Rosenberger وزملاؤه، 1989). يَظهر المرض فجأةً ويكون عندها معدل الإصابة عالياً، يصل إلى نحو 100 % (Winterfield وزملاؤه، 1962؛ Allan وزملاؤه، 1972؛ Rosenberger وزملاؤه، 1989 ؛ Lukert و Saif، 1997). يرتفع معدل النفوق بشكل حاد بعد 48 ساعة من الإصابة ليبلغ نحو 30-40 % (OIE، 2004)، ثمّ ينخفض بسرعة بعد 2-3 أيام. ويصيب المرض طيور أخرى مثل الديك الرومي والبط والنعام دون ظهور أعراض سريرية (OIE، 2004).

ينتمي العامل المسبب لعائلة فيروسات البيرنا (Birnaviridae)، جنس فيروسات البيرنا (Aviabirnavirus) ، (Brown، 1986؛ Chettle وزملاؤه، 1989؛ OIE، 2004؛ Patricia وزملاؤه، 2006؛ Pedro وزملاؤه، 2008)، ولفيروس مرض الجامبورو نمطين مصليين 1 و 2 (McFerran وزملاؤه، 1980؛ Jackwood وزملاؤه، 1984؛ OIE، 2004). يُصيب النمط المصلي 1 الطيور الفتية، في حين لا تظهر أية أعراض إكلينيكية على الطيور البالغة (OIE، 2004).

إنّ النمط المصلي1 هو المسؤول عن إحداث الإمراضية في الدجاج في العديد من البلدان، ويُسبب تثبيطاً للجهاز المناعي للطيور (Patricia وزملاؤه، 2006 ؛ Dormitorio وزملاؤه، 2007). ويضم هذا النمط العترة الكلاسيكية (Classic IBDV)، والعترة شديدة الضراوة (VV IBDV)، والعترة المتغايرة (Variant IBDV).

تتصف الإصابة بمرض الجامبورو من النوع المصلي1 بالخمول وارتفاع في درجة الحرارة (Cho و Edgar، 1969)، وانخفاض في الشهية وانتفاش الريش وإسهال مصفر غالباً (Cosgrove، 1962؛ OIE، 2004) والتجفاف وتأخر النمو وحدوث النفوق (Lukert و Saif،1997). وتعتمد شدة الإصابة على عمر الطيور ومدى حساسيتها إضافة إلى فوعة العترة ومستوى المناعة عند الطيور.

أما بالنسبة للآفات التشريحية فيُلاحظ تضخم ونزف في جراب فابريشيوس (Lukert و Saif، 1997؛ OIE، 2004) ونزف حبري على عضلات الصدر والفخذين بعد 4 - 6 أيام من الإصابة، ويُغطى جراب فابريشيوس بغشاء جيلاتيني مصفر بعد 7 - 10 أيام من العدوى (Rosenberger وزملاؤه، 1989). كما يتصف مرض الجامبورو بتخريب الجهاز المناعي لاسيّما الخلايا اللمفاوية البائية في جراب فابريشيوس.

وهناك عدة اختبارات لكشف وتنميط فيروس الجامبورو، منها اختبار المقايسة المناعي الأنزيمي اللاقط للمستضد (ACE)– ELISA والتألق المناعي، والترسيب بالآجار الهلامي واختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل للنسخ العكوس Reverse transcription -Polymerase chain reaction (RT-PCR)، ويُعد اختبار الاليزا اللاقطة من الاختبارات الحساسة والنوعية لكشف وتنميط فيروس مرض الجامبورو باستعمال الأضداد وحيدة النسيلة.

ينتشر مرض الجامبورو في الجمهورية العربية السورية مسبباً خسائر اقتصادية كبيرة في صناعة الدواجن، تحدث الإصابة عادةً بين عمر 19 - 35 يوماً، وتؤدي إلى نسبة نفوق بين 1-25 % (فاضل، 2005) ، ولهذا يشكل فيروس مرض الجامبورو خطراً دائماً مهدداً لصناعة الدواجن عند توافر الشروط المناسبة (Martin وزملاؤه،2007؛ Pedro وزملاؤه، 2008).

هدفت الدراسة إلى:

1 - الكشف عن وجود فيروس مرض الجامبورو في قطعان دجاج اللحم في سورية وتحديد معدل الإصابة والنفوق.

2 - تحديد نمط فيروس مرض الجامبورو في سورية.

مواد البحث وطرائقه

- بيض دجاج مخصب خالٍ من المسببات المرضية (SPF eggs) مصدره شركة لوهمان الألمانية.
- استُعملت مجموعة تشخيصية لاختبار المقايسة المناعي الأنزيمي اللاقط للمستضد (ACE- ELISA kit) لمرض الجامبورو من إنتاج شركة SYNBIOTICS الفرنسية.

جمع العينات:

جُمعت العينات من 35 مزرعةً لتربية دجاج اللحم مصابةً بمرض الجامبورو، وموزعة على عدة محافظات في الجمهورية العربية السورية باستخدام العينة المتعددة المراحل (Multistages Sampling)، حيث قُسمت إلى ثلاث مناطق (منطقة شمالية، ووسطى، وجنوبية)، وتراوحت سعة المزرعة بين 6000 – 30000 طيراً (الجدول1)، إذْ جُمعت خمس عينات من أجربة فابريشيوس من كل مزرعة ظهر على طيورها الأعراض الأكلينيكية مثل الخمول وارتفاع درجة الحرارة، وانخفاض الشهية وانتفاش الريش، وإسهال مُصفر غالباً، والتجفاف وتأخر النمو وحدوث النفوق. والآفات التشريحية مثل تضخم ونزف في جراب فابريشيوس، ونزف حبري على عضلات الصدر والفخذين ووجود غشاء جيلاتيني مصفر يغطى جراب فابريشيوس. وقد اُستعملت من أجل ذلك أدوات جراحية معقمة.

الجدول1. المناطق والمزارع التي جمعت منها العينات.

المنطقة	عدد المزارع	عدد الطيور	عدد العينات
الشمالية	11	92550	55
الوسطى	15	140500	75
الجنوبية	9	75300	45
المجموع	35	308350	175

عزل الفيروس:

وُزنت أجربة فابريشيوس ووضعت في أنابيب ابندروف، ثم أضيف 1مل من محلول ممدد المستضد (Antigen Dilution Buffer) إلى1غ من جراب فابريشيوس، وسُحق جراب فابريشيوس وتمت مجانسته بوضع كمية من الرمل البحري المعقم، ورُشح المعلق باستعمال مرشح ذو مسامات قطرها 0.22 ميكرون، وجُمدت العينة في درجة الحرارة – 20 °م، ثمّ أذيبت و أُعيدت إلى المجمدة وكُررت العملية ثلاث مرات، بعد ذلك نُبذ المعلق (1500 x g) مدة 10 دقائق لفصل السائل الطافي عن الراسب وأُخذ السائل الطافي للعينات وحُفظ في الدرجة –20 °م، وتمّ التخلص من الراسب.

الحقن في أجنة بيض الدجاج:

تم حقن بيض دجاج مخصب خالٍ من العوامل الممرضة (SPF)، عن طريق الحقن في الغشاء المشيمي اللقانقي (Chorio Allantoic Membrane) بعمر 11 يوماً (Karunakaran وزملاؤه 1993).

اختبار المقايسة المناعية الأنزيمية اللاقطة للمستضد:

اُستعمل اختبار المقايسة المناعي الأنزيمي اللاقط للمستضد حسب الطريقة الموصوفة من قبل Snyder وزملاؤه (1992)، حيث اسُتعمل قالب يتألف من 96 حفرة تحتوى على الأضداد وحيدة النسيلة من النمط (MAb #8) للكشف عن وجود فيروس مرض الجامبورو في العينة، وقالب آخر يحتوى على أربعة أشرطة يتألف كل شريط من ثماني حفر يحتوي الأول على الأضداد وحيدة النسيلة من النمط (MAb #8) للكشف عن فيروس مرض الجامبورو في العينة، وثلاثة أشرطة تحتوي على الأضداد وحيدة النسيلة من النوع (MAb R63) و (MAb B69) و (MAb #10) لتنميط فيروس مرض الجامبورو. واُستعمل الضد المقترن بالانزيم

بيروكسيداز (Horse Radish Peroxidase)، ومُدد بنسبة 1 : 100.

أُذيب مستخلص الجراب ومُدد بنسبة 1:25 في دارئة ممدد المستضد، ثم أُضيف 80 ميكروليتر من محلول ممدد المستضد إلى جميع حفر القالب بما فيها حفر الشاهد.

أُضيف 20 ميكروليتر من العينات المخففة 1:5 إلى حفر القالب الذي يحوي أضداد من النمط (MAb #8) ماعدا حفر الشاهد السلبي والإيجابي، ثم تمت إضافة 20 ميكروليتر من ممدد المستضد إلى حفر مستضد الشاهد الإيجابي، وحُضن القالب مدة ليلة كاملة في درجة الحرارة + 4 م° إلى + 8 م°.

غُسلت الحفر ثلاث مرات بإضافة 300 ميكروليتر من محلول الغسيل وتُركت مدة 3 دقائق في كل مرة غسيل، ثمّ أُضيف 100 ميكرولتر من محلول المصل الإيجابي للجامبورو إلى جميع الحفر بما فيها حفر مستضد الشاهد، وحُضن القالب مدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة (22-24 م°)، ثمّ غُسلتْ الحفر ثلاث مرات بمحلول الغسيل وتُركت مدة 3 دقائق في كل مرة.

أُضيف 100 ميكروليتر من المرتبط إلى كل الحفر بما فيها حفر الشاهد وحضنت لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة 22 - 24 م°. وغسلت الحفر ثلاث مرات بمحلول الغسيل كما في السابق.

أُضيف 100 ميكروليتر من الركيزة (ABTS peroxidase substrate) في كل حفرة وحُضنت مدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة 22-24 م°. ثم أُوقف التفاعل بإضافة 100 ميكروليتر من محلول موقف التفاعل لكل حفرة، وقُرئت الكثافة الضوئية على موجة طولها 405 نانومتر في قارئ الاليزا.

أُعتبرت العينات التي قيمة كثافتها الضوئية أكبر من 0.6 إيجابية وهذا تطابق مع وجود آفات في جراب فابريشيوس، في حين كانت العينات التي كانت قيمها أقل من 0.3 سلبية.

تنميط فيروس مرض الجامبورو:

تمَّ التفريق بين العترة الكلاسيكية والعترات المتغايرة الثلاثة (GLS, E/Del, RS593) لفيروس مرض الجامبورو في القطعان المصابة باستعمال أضداد وحيدة النسيلة نوعية للعترات الكلاسيكية والمتغايرة (الجدول 2)، حيث تمَّ استعمال قالب يحتوي على أضداد وحيدة النسيلة (#8 , #10 , B69, R63)، واسُتعملت الخطوات السابقة نفسها المتبعة عند الكشف عن وجود فيروس مرض الجامبورو.

الجدول 2. تنميط فيروس الجامبورو باستعمال الأضداد وحيدة النسيلة.

Virus Type	# 8	B69	R63	# 10
Classic	+	+	+	+
GLS	+	-	-	+
E / Del	+	-	+	-
RS593	+	-	-	-

التحليل الإحصائي:

تم استعمال اختبار بيرسون مربع كاي Pearson's Chi Square لمعرفة الفروق المعنوية بين الأعمار التي تمت فيها الإصابة بمرض الجامبورو.

النتائج والمناقشة

أظهرت الدراسة أنَّ مرض الجامبورو ينتشر في الجمهورية العربية السورية، حيث تمَّ تشخيص المرض اعتماداً على عمر القطيع والأعراض الإكلينيكية والآفات التشريحية النموذجية لمرض الجامبورو، التي تمثلت بالخمول وارتفاع في درجة الحرارة وانخفاض في الشهية وانتفاش الريش وإسهال مصفر غالباً والتجفاف وتأخر النمو وحدوث النفوق، والآفات التشريحية مثل تضخم ونزف في جراب فابريشيوس ونزف حبري على عضلات الصدر والفخذين ووجود غشاء جيلاتيني مصفر يغطي جراب فابريشيوس، مع العلم أن جميع القطعان قد حُصنت ضد مرض الجامبورو بلقاحات ضعيفة ومتوسطة الضراوة من نمط العترة الكلاسيكية، وقد تطابقت الأعراض المرضية مع شدة الإصابة والحالة المناعية للطيور، وعوامل الإجهاد، وهذا يتوافق مع نتائج Lukert و Saif (1997).

يُلاحظ من الجدول 3 بأنَّ معدل الإصابة بمرض الجامبورو في المزارع المصابة كان 70 % في الطيور التي تراوحت أعمارها بين 18 و 37 يوماً، وهي أعلى معنوياً من الإصابة في الأعمار الأخرى ($P<0.05$)، وهذا يتوافق مع ما وجده فاضل (2005) في دراسته الحقلية والوبائية على دجاج اللحم في مزارع سورية ومع نتائج Lukert و Saif (1997)، وكان معدل النفوق 40 % وهذا يتوافق مع نتائج Cosgrove (1962)، ولا يتوافق مع نتائج تجارب Chettle وزملاؤه، (1989) في بريطانيا، حيث كانت العترة شديدة الضراوة، ومعدل النفوق بلغ 90 %، في حين بلغت في فرنسا نحو 100 % بالعترة نفسها (Van Den Berg وزملاؤه، 1991)، وقد يُعزى ذلك إلى أنَّ الطيور بهذا العمر تكون أكثر حساسية للإصابة بهذا المرض، كما سُجلت حالات قليلة بالإصابة بالجامبورو في الطيور التي يزيد عمرها على

40 يوماً، ويمكن أن يُفسر ذلك نتيجةً لضعف مقاومة الطيور الناجمة عن الإصابات ببعض الأمراض الأخرى (النيوكاسل- الكوكسيديا – الاشريكية القولونية - المايكوبلازما) التي مهدت إلى ظهور أعراض مرض الجامبورو في الأعمار المتقدمة، وهذا ما يتوافق مع نتائج Kosters وزملاؤه (1972).

الجدول 3. معدل الإصابة والنفوق وفقاً لعمر الطيور.

العمر	1 – 15 يوم	18 – 37 يوم	37 – 50 يوم
عدد المزارع المصابة	0	30	5
الإصابة %	0	70	14
النفوق %	0	1 - 40	

لوحظ على الأجنة الناقفة والحية المختبرة احتقان ونزف كدمي وحبري على طول أماكن نمو الريش ومفاصل القدم إضافةً إلى وجود استسقاء تحت الجلد، أما الأكباد فكانت ذات لون مخضر ومتضخمة وعليها توضعات لبقع متنكرزة، وهذا ما يتفق مع ما وجده عبد العزيز (2000)، وكان لون الطحال قرنفلي مع وجود بؤر تنكرزية. ولوحظ تضخم في الكلى، ونزف دموي على الغشاء المشيمي اللقانقي، وهذا يتفق مع نتائج Mcallister وزملاؤه (1995) التي أظهرت أنَّ التغيرات السابقة على أجنة البيض تسببها العترة الكلاسيكية.

يعتمد اختبار الاليزا اللاقطة على استعمال الأضداد وحيدة النسيلة ضد بروتينات فيروس مرض الجامبورو، ويُعَدُّ البروتين (VP2) لفيروس الجامبورو مهم في حدوث الاستجابة المناعية لمرض الجامبورو (Azad وزملاؤه، 1990و Pedro وزملاؤه، 2008) والزوائد الموجودة عليه لها دور في تمييز الأنواع المصلية لفيروس مرض الجامبورو (Becht و Muller، 1988).

أظهرت نتائج اختبار الأليزا اللاقطة أنَّ هناك 29 عينة إيجابية للأضداد وحيدة النسيلة من النوع (MAb #8)، ما يدل على وجود فيروس مرض الجامبورو فيها (الجدول 4)، وهذا يتوافق مع ما وجده Snyder وزملاؤه (1992) و Lamichhane وزملاؤه (2000).

الجدول 4.عدد العينات الإيجابية للأضداد وحيدة النسيلة من النمط # 8 في المناطق المدروسة.

المنطقة	عدد العينات	عدد العينات الإيجابية
الشمالية	11	9
الوسطى	15	12
الجنوبية	8	9
المجموع	35	29

عند تنميط العترة المعزولة تمت ملاحظة أنّ الأضداد وحيدة النسيلة من النمط (MAb #8) و (MAb R63) و (MAb B69) و (MAb #10) كانت متوافقة مع العترة الكلاسيكية ولم تكن متوافقة مع العترات المتغايرة (GLS , E/Del , RS593) (الجدول 5)، وهذا يتوافق مع النتائج التي حصل عليها Oppling وزملاؤه (1991) و Ching وزملاؤه (2007)، في حين كانت نتائج العزولات المصرية (Hussein وزملاؤه، 2003) مشابهة للعترة المتغايرة (E/Del)، ولم تتوافق مع نتائج العزولات الأوروبية (Chettle وزملاؤه، 1989)، حيث كانت العترة شديدة الضراوة، وكانت نسبة النفوق 70 %، ولم تتوافق مع نتائج العزولات الأمريكية (Lana وزملاؤها، 1992)، حيث كانت العترة متغايرة من النمط (A, E, GLS).

الجدول 5. تنميط فيروس الجامبورو باستعمال الأضداد وحيدة النسيلة.

Virus Type	# 8	B69	R63	# 10
Classic	+	+	+	+

يُستنتج من هذه الدراسة أنَّ مرض الجامبورو ينتشر في دجاج اللحم في مناطق التربية المكثفة في الجمهورية العربية السورية، وأنَّ الفيروس المعزول من قطعان دجاج اللحم المدروسة هو فيروس الجامبورو الذي ينتمي إلى نمط العترة الكلاسيكية، وأنَّ ذروة حدوث المرض كانت في الأعمار بين 18و 38 يوماً، وأن الأعراض الإكلينيكية والآفات التشريحية لا تظهر في جميع الإصابات، وهذا يتعلق بشدة ضراوة العامل المسبب والحالة المناعية للطيور وعوامل الإجهاد.

المراجع

الغادري، غسان. 1986 .تغذية الحيوان والدواجن. منشورات جامعة دمشق.

فاضل، محمد. 2005 .دراسة حقلية ووبائية عن مرض الجمبورو في دجاج اللحم. مجلة جامعة البعث. المجلد 27 (5)، 244 - 259.

عبد العزيز، فهيم. 2000. دراسة بعض الخصائص الحيوية لذراري فيروس التهاب الجراب المعدي المعزولة من الفروج. مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث – سلسلة العلوم الزراعية – المجلد 22 (10).

Allan, W. H., J. T. Faragher., G. A. Cullen. 1972. Immun osuppression by the infectious bursal agent in chickens immunised against Newcastle disease. Vet

a One-Step Strip Test for the Diagnosis of Chicken Infectious Bursal Disease. Avian Diseases 49(2):177-181.

Hirai, K., S. Shimakura., E. Kawamoto., F. Taguchi., S. T. Kim., C. N. Chang., Y. Iritani. 1974. The immunodepressive effect of infectious bursal disease virus in chickens. Avian Dis, 18:50-57.

Hussein, H. A., A. M. Aly., H. Sultan., M. Al-Safty. 2003. Transmissible viral proventriculitis and stunting syndrome in broiler cickens in Egypt Isolation and characterization of variant infectious bursal disease virus.V. M. J. Giza,. 51(3): 445-462.

Jackwood, D. J., Y. M. Saif. , P. D. Moorhead., G. Bishop.1984. Failure of two serotype II infectious bursal disease viruses to affect the humoral immune response of turkeys.Avian Dis 28:100-116.

Kosters, J., H. Becht., R. Rudolph. 1972. Properties of the infectious bursal agent of chicken (IBA). Med Microbiol Immunol 157:291-298.

Karunakaran,K., M. Thanappapilldi., N. Raghavan. 1993. Comp. lmmun. Microbiol. infect. Dis. Vol. 16, No. 3, pp: 241-244.

Lamichhane, C. M., L. Jerome., B. Adenikinju. 2000. ELISA for the detection and differentiation of infectious bursal disease virus. Presented at 49th western poultry disease conference, Sacramento, CA. 2000.

Lana, D. P., C. E. Beisel., R. F. Silva.1992. Genetic mechanisms of antigenic variation in infectious bursal disease virus : Analysis of anaturally occurring variant virus. Virus Genes 3:247-259.

Lasher, H. N., S. M. Shane. 1994. Infectious bursal disease. World's Poult.Sci. 50:133–166.

Lukert, P. D., Y. M, Saif . 1997. In : Disease of Poultry, 11th edition, B.W., Calnek, ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA:721-738.

Res 90:511- 512.

Azad, A. A., I. Macreadie., P. Vaughan., M. Jagadish., N. McKern., H. G. Heine., P. Failla., C. Ward, A. Chapman., K. Fahey. 1990. Full protection against an immunodepressive viral disease by a recombinant antigen produced in yeast. Vaccines 90:59- 62.

Becht, H., H. K. Müller. 1988. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. J. Gen. Virol. 69:631-640.

Benton, W. J., MS. Cover ., J. K. Rosenberger., R. S. Lake. 1967. Physicochemical properties of the infectious bursal agent (IBA) of chickens. Avian DIS 11:438- 445.

Brown, F. 1986. The classification and nomenclature of viruses: Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai. Intervirology 25:141-143.

Cho, Y., S. A. Edgar. 1969. Characterization of infectious bursal disease .Poultry Science, 48: 2102-2109.

Chettle, N., J. C. Stuart., P. J. Wyeth. 1989.Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. Vet. Rec. 125:271-272.

Ching, C. W., P. Rubinelli., T. L. Lin. 2007. Molecular Detection and Differentiation of Infectious Bursal Disease Virus. Avian Diseases, 51(2):515-526.

Cosgrove, A. S. 1962. Anapparently new disease of chickens avian nephrosis. Avian Dis, 6:385-389

Dormitorio, A, T. V., J. J. Giambrone., A. C. K. Guo., A., D. J. Jackwood., B. 2007. Molecular and Phenotypic Characterization of Infectious Bursal Disease Virus Isolates. Avian Diseases, 51(2): 597-600.

Faragher, J. T. 1972. Infectious bursal disease of chicken,Vet. Bull. 42: 361-369.

Gai, Z.Q., Y. Y. Yan., Q. G. Jun. 2005. Development of

Avian Diseases 52(4):670-674.

Rosenberger, J. K., S. S. Cloud., J. Gelb., Jr. E. Odor., J. E. Dohms. 1985. Sentinel bird survey of Delmarva broiler flocks. Proc 20th Natl Meet Poult Health Condemn: Ocean City, MD: 94-101.

Rosenberger, J. K. 1989. infectious bursal disease viruses. In: Isolation and idenrification of Avian pathogens, 3rd ed Kendall/Hunt publishing Company, Dubuque, Iowa:165-166.

Snyder, D. B., V. N. Vakharia., P. K. Savage. 1992. Naturally-occurring neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease virus in the United States. Arch. Virol, 127:89-101.

Van den Berg, T., P. Gonze., M. G. Meulemans. 1991. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation andcharacterisation of a highly virulent strain. Avian Pathol.20: 133-143.

Van der Sluis, W. 1999. world poultry disease update. World Poult. 15:30-32.

Winterfield, R. W., S. B. Hitchner. 1962. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. Am J Vet Res 23:1273-1279.

McFerran, J. B., M. S. McNulty., E. R. McKillop., T. J. Conner., R. M. McCracken., D. S. Collins., G. M. Allan.1980. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkey and duck: Demonstration of a secondserotype. Avian Pathol 9:395- 404.

Marquardt, W., R. B. Johnson., W. F. Odenwald., A.Schlotthober.1980. Anin directenzyme -linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. Avian Dis24:375- 385.

McAllister, J. C., C. D. Steelman, L. A. Newberry., J.K. Skeeles. 1995. Isolation of infectious bursal disease virus from the lesser mealworm, Alphitobius diaperinus (Panzer).Poult Sci 74(1):45- 49.

Martin, A. M., F. Francesca., B. Ilaria., E. Nicolas., C. Raffaella., C. Paolo. 2007. Genetic and antigenic characterization of infectious bursal disease viruses isolated in italy during the period 2002- 2005. Avian Diseases Digest, 2(4).

Nielson O. L., P. Sorensen., J. Heedemand., S. Laursen B., P.H Jorgensen.1998 inflammatory response of different chicken lines and B haplotypes to infection with infectious bursal disease virus. Avian Pathology.27: 181- 189.

OIE, Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. 2004.

Oppling,V., H. Muller., H. Becht. 1991. Heterogeneity of the antigenic site responsible for the induction of neutralizing antibodies in infectious bursal disease virus. Archives of Virology, 119: 211-223.

Patricia R., M. G. Calderón., S. Aguirre., O. Periolo., J. La Torre., N. Mattion. 2006. Characterization of Infectious Bursal Disease Viruses from Argentina. Avian Diseases 50(2):245-251.

Pedro Villegas A., M. Hamoud., L. B. Purvis., F. Perozo. 2008. Infectious Bursal Disease Subunit Vaccination.