

KARAKTERISTIK MOLEKULAR STRAIN VIRUS VAKSIN INFECTIOUS BURSAL DISEASE (IBD) MENGGUNAKAN METODE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) DAN SEQUENCING

¹Ernes Andesfha, ¹Irma Rahayuningtyas, ²Rahajeng Setyawati, ²Ketut Karuni N. Natih,
²Yati Suryati

¹Unit Uji Bakteriologi

²Unit Uji Virologi

Balai Besar Pengujian Mutu Dan Sertifikasi Obat Hewan, Gunungsindur – Bogor, 16340

ABSTRAK

Telah dilakukan pengujian PCR dan DNA *sequencing* dari 14 sampel vaksin IBDV yang diambil dari beberapa peternakan di 14 Propinsi di Indonesia tahun 2015. Tujuan mengidentifikasi dan menganalisa asam amino gen PV2 sehingga diketahui *pathotype* virus IBDV menggunakan teknik PCR dan DNA sequencing. Sampel vaksin IBDV ditumbuhkan di telur ayam SPF hingga pasase kedua dan diambil cairan alantois untuk diuji PCR dengan target gen PV2. Sampel positif pada uji PCR dilanjutkan uji DNA *sequencing* untuk dianalisa asam amino-asam amino penting pada gen PV2. Hasil uji PCR diperoleh 13 sampel vaksin IBDV positif IBD virus pada panjang amplikon 723 bp sedangkan 1 sampel vaksin IBDV negatif. Analisis asam amino hasil uji DNA sequencing diperoleh 5 sampel vaksin IBDV termasuk *pathotype attenuated* vaksin, 6 sampel *pathotype very virulent* (vvIBDV), 1 sampel *pathotype classical* IBDV dan 1 sampel *pathotype atypical* IBDV.

Kata kunci: vaksin, IBDV, PCR, DNA *sequencing*, *pathotype*

ABSTRACT

PCR and DNA sequencing tests of 14 IBDV vaccine samples were taken from several farms in 14 provinces in Indonesia in 2015 have been conducted. The purpose of this study was to identify and analyze the amino acid of PV2 gene so that IBDV virus *pathotype* was able to be confirmed using PCR technique and DNA sequencing. Samples of IBDV vaccine were grown in SPF chicken eggs for the second passage and alantoic fluid was taken for PCR test with target PV2 gene. Positive samples in PCR assay were confirmed by DNA sequencing test to analyze important amino acids in PV2 gene. PCR test results obtained from 13 samples of IBDV positive IBD virus vaccine at 723 bp amplicon length whereas 1 sample resulted negative IBDV vaccine. Analysis of amino acid DNA sequencing test results obtained 5 samples *pathotype attenuated* vaccine, 6 samples highly virulent *pathotype* (vvIBDV), 1 sample classic IBDV *pathotype* and 1 sample atypical IBDV *pathotype*.

Keywords: vaccine, IBDV, PCR, DNA *sequencing*, *pathotype*

PENDAHULUAN

Infectious bursal disease virus (IBDV) yang dikenal dengan penyakit “Gumboro” menyerang secara akut pada unggas muda dan bersifat *imunopresif* yaitu menekan pembentukan antibodi humoral dengan merusak sel limfoid *bursa fabricius* ⁽²⁵⁾. Penyakit IBDV menyebar luas pada peternakan komersial ayam muda yang menyebabkan penyakit sangat infeksius, mudah menular dan cepat menyebar sehingga mengakibatkan kerugian ekonomi yang sangat besar ⁽²⁵⁾.

Virus IBD termasuk dalam famili *Birnaviridae* dan genus *Avibirnavirus*, virus IBDV tidak memiliki amplop dan merupakan *double stranded* RNA dengan genom yang terdiri dari dua segment yaitu segment A 3300 bp dan segment B 2800 bp ⁽²²⁾. Segment A menyandi sebagai prekursor poly protein yang diproses di tiga protein *mature* yaitu VP2, VP3 dan VP4. Gen VP2 gen yang paling sering diteliti karena berperan besar sebagai protein struktur yang mengandung daerah antigenik yang bertanggungjawab terhadap produksi antibodi netralisasi di tubuh ayam dan sebagai faktor penentu patogenisitas, gen PV2 juga memiliki daerah *hypervariabel* dengan variasi asam amino yang tinggi sehingga menentukan strain virus IBD ⁽¹¹⁾.

Terdapat dua *serotype* IBDV, *serotype* I bersifat patogenik pada ayam yang menyebabkan penyakit Gumboro, sementara *serotype* II bersifat non patogenik pada ayam ⁽²⁴⁾. Beberapa peneliti membagi *serotype* I dibagi dalam beberapa grup, Zierenberg K membagi *serotype* I berdasarkan variasi antigenik dan virulensi yaitu *classical strain*, *variant strain*, dan *very virulent strain* ⁽³⁶⁾. Jackwood and Somer menggolongkan virus lapangan dan strain vaksin ke dalam enam grup molekular yaitu *variant strain* IBDV ditempatkan dalam grup 1 dan 2, *classical strain* dalam grup 3 dan 4, *strain Lukert* dalam grup 5, dan vvIBDV dalam grup 6 ^(17,18). Dalam penelitian secara *in vivo*, *serotype* I IBDV hanya dibagi dalam grup *classical* dan *variant strain* ⁽¹⁵⁾, sedangkan penelitian *serotype* I IBDV secara *in vitro* menggunakan monoklonal antibodi dan nukleotida sequencing dikelompokkan dalam empat grup yaitu *classical*, *antigenic variant*, *very virulent* (vvIBDV) dan *attenuated strain* ^(25,30).

Virus IBDV bersifat sangat kontagius dan persisten di dalam lingkungan kandang ayam ⁽²⁹⁾ dalam *litter* dapat bertahan selama 60 hari ⁽³¹⁾, kandang yang pernah ditempati ayam yang terinfeksi gumboro akan tetap bersifat infeksius terhadap ayam lain selama 54 – 122 hari sedangkan sisa pakan, air minum dan kotoran akan tetap infeksius selama 52 hari. Virus

IBD dapat ditemukan dalam leleran tubuh dan kotoran ayam terinfeksi ⁽²⁹⁾. Ayam yang terinfeksi virus IBDV akan mengeluarkan virus melalui fesesnya. Makanan, air minum dan *litter* kandang menjadi tercemar, ayam lain dapat terinfeksi melalui ingesti virus secara peroral ⁽⁶⁾. Ayam juga dapat tertular melalui kontak langsung dengan ayam sakit karena sifat alami virus yang sangat kontagius ⁽³⁾.

Pencegahan infeksi virus IBDV pada ayam dapat dilakukan melalui vaksinasi pada tingkat *breeder* maupun peternakan komersial. Vaksinasi pada *parent stock* diharapkan dapat menurunkan sejumlah antibodi pada DOC yang dapat melindungi anak ayam dari infeksi awal virus IBDV ⁽²⁹⁾. Variasi antigenik diantara *strain* IBDV adalah tantangan utama dalam mendesain suatu strategi untuk vaksinasi, karena vaksin dari satu *type* antigenik tidak dapat memberikan proteksi pada ayam terhadap *strain* lainnya ⁽²³⁾.

Strain classical menyebabkan kerusakan *bursa fabricius* dan nekrosis lymphoid yang menyebabkan kematian 20 – 30% ⁽²⁵⁾. Pada pertengahan tahun 1980 vvIBDV *strain* pertama ditemukan dan menyebabkan kematian 60 – 70% pada ayam *broiler* dan *layer*, selanjutnya *strain* vvIBDV menyebar ke Timur Tengah, Asia, Afrika dan Amerika Selatan ⁽⁴⁾, *strain* vvIBDV di Indonesia telah ditemukan dan dipublikasi pada tahun 2006 ⁽²⁸⁾. Di Indonesia infeksi IBDV terus menjadi masalah seperti di negara lainnya. Diagnosa penyakit Gumboro dapat dilakukan dengan melihat gejala klinis, patologi anatomi, metode uji virus *neutralization assay*, antigen *capture ELISA*, *in vivo cross protection*, *polymerase chain reaction (PCR)*, *restriction fragment length polymorphism (RFLP)* ^(8,9,33).

Penggunaan teknik molekular untuk mendeteksi dan mengidentifikasi *strain* IBDV telah digunakan secara luas, melalui metode PCR dapat mengamplifikasi bagian genom virus IBDV. Metode PCR dapat mendeteksi virus IBDV secara cepat, spesifik dan akurat sehingga virus IBDV dapat diketahui sedini mungkin dan tindakan pengendalian penyakit dapat segera dilakukan. Namun untuk mengetahui karakter molekular virus IBDV diperlukan pengujian *sequencing* sehingga diketahui *pathotype* dengan melihat residu asam amino pada posisi tertentu, dengan *tools BLAST* dapat diketahui identitas *strain* virus IBDV, melalui analisa bioinformatika dapat diketahui perbedaan / jarak genetik (nukleotida), analisa pohon *phylogenetik* untuk mengetahui evolusi/kekerabatan *strain* virus vaksin dan isolat IBDV di lapangan.

Kajian ini bertujuan untuk mengidentifikasi *pathotype* virus vaksin IBDV yang digunakan di Indonesia sehingga terjamin keasliannya, untuk mengetahui karakter molekular virus vaksin IBDV menggunakan metode PCR dan *sequencing* dengan target gen PV2. Karakter molekular virus vaksin IBDV selanjutnya dibandingkan dengan *reference sequen* isolat dari Indonesia dan beberapa negara di Asia, Eropa dan Amerika. Hasil kajian ini diharapkan dapat menambah informasi karakter tingkat molekular dari virus vaksin yang digunakan di Indonesia.

MATERI DAN METODE

MATERI

a. Sampel

Sampel vaksin bentuk kering beku yang dipasase dua kali di telur embrio tertunas (TET)

Tabel 1. Data sampel vaksin IBDV yang telah dipasase

No	Kode Sampel	Strain IBDV	Pathotype
1	PV-0012015	D22	Mild
2	PV-0032015	D22	Mild
3	PV-0052015	D22	Mild
4	PV-0092015	D22	Mild
5	PV-0022015	Cheville 1/68	Intermediate Plus
6	PV-0042015	Cheville 1/68	Intermediate Plus
7	PV-0072015	Cheville 1/68	Intermediate Plus
8	PV-0132015	Cheville 1/68	Intermediate Plus
9	PV-0142015	Cheville 1/68	Intermediate Plus
10	PV-0062015	Winterfield 2512	Intermediate Plus
11	PV-0082015	wIBDV#95	Intermediate Plus
12	PV-0102015	Cheville 1/68	Intermediate Plus
13	PV-0112015	Cheville 1/68	Intermediate Plus
14	PV-0122015	GM 97	Hot
15	Kontrol Positif IBDV	Leukert	Classical

Tabel 2. Accession number reference sequen PV2 IBDV dari GenBank

Strain IBDV	Patotype	Negara	Accession Number
Cu1 wt	<i>Classical</i>	Germany	AF362747.1
F5270	<i>Classical</i>	UK	D00869.2
STC	<i>Classical</i>	USA	D00499.1
-	<i>Classical</i>	Egypt	KF4444831
002-73	<i>Classical</i>	Australia	X03993.1
P3009	<i>Classical</i>	Taiwan	AF109154
Indo1	<i>wIBDV</i>	Indonesia	AF508738.1
Indo5	<i>wIBDV</i>	Indonesia	AF508742.1

Indo6	<i>vvIBDV</i>	Indonesia	AF508743.1
Indo8	<i>vvIBDV</i>	Indonesia	AF508745.1
Tasik94	<i>vvIBDV</i>	Indonesia	AF322444
96108	<i>vvIBDV</i>	France	AJ001948
HK46	<i>vvIBDV</i>	Hongkong	AF092943
99009	<i>vvIBDV</i>	Brazil	AJ878902.1
D6948	<i>vvIBDV</i>	Netherland	AF240686
-	<i>vvIBDV</i>	Egypt	KF444824
IBDV plus	<i>vvIBDV</i>	India	KJ547670
V90/TW95	<i>vvIBDV</i>	Taiwan	JQ315162.1
IBDV78	<i>vvIBDV</i>	Nigeria	JX424077.1
HKL6	<i>Atypical</i>	Hongkong	AF051839.1
Indo11	<i>vvIBDV/attenuated</i>	Indonesia	AF508748.1
CT	<i>Vaccine/CEF_adapted</i>	France	Y14961.1
Cu-1M	<i>Vaccine/CEF_adapted</i>	Germany	AF362771.1
PBG98	<i>Attenuated</i>	UK	D00868.1
Cu-1	<i>Attenuated</i>	Germany	X16107
GLS5	<i>Antigent Variant</i>	USA	M97346.1
VarA	<i>Antigent Variant</i>	USA	AF293792.1

b. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah Mesin PCR *thermocycler*, Mupid 2, *Nano Drop* 2000, Microwave, *single channel*, *tips filter* ukuran 0,5-10 μL , 10–100 μL , 100–1000 μL , *mini spin*, *vortex*, *vortex plate*, *plate 96 well*, *tube 0.2 mL*, *capillary array 50 cm*, *septa ABC*, *CBC*, *septa plate 96*, dan *retainer plate*, mesin *Genetic Analyzer* 3500 delapan kapiler.

Bahan yang digunakan adalah primer spesifik target gen PV2 virus IBD, *Qiaamp viral RNA Mini Kit* QIAGEN, CAT : 52904), *ethanol absolut* 96%, *Qiagen One – Step RT PCR Kit* (Qiagen, Cat : 210212)., *Destillated water* (DW), *RT-PCR Grade Water*, agarose, SYBR Safe, *Buffer Tris Acetate EDTA* (TAE) 10X, DNA marker 100 bp, *blue jus*, *blanko solution*, tissue kim wipes, *Big Dye Terminator Kit*, *Big Dye X Terminator Kit*, *Buffer Anode Container* (ABC), *Cathoda Buffer Container* (CBC), dan Polymer POP7.

METODE

Metode PCR

Ekstraksi, sampel vaksin yang telah dipasase, kontrol positif dan kontrol negatif diekstraksi menggunakan kit dan metode ekstraksi *Qiaamp viral RNA Mini Kit*. **Master mix** menggunakan sepasang primer spesifik gen PV2 virus IBD *Reference Zierenberg et*

2001, forward PV2 CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACAACAGCCAACATCAACG, reverse VP2 TCACACAGGAAACAGCTATGACGCTCGAAGTTTRTC. Reagent master mix PCR menggunakan Qiagen *One-Step RT-PCR Kit*, yaitu 5X buffer RT 5 µL, dNTP 1 µL, enzyme mix 1 µL, Primer PV2_F (20 µM) 1 µL, Primer PV2_R (20 µM) 1 µL, RT-PCR Grade Water 5.5 µL, RNA hasil ekstraksi 5 µL. **Reverse Transcriptase (RT)** dan **Amplifikasi** : Hot Start 50°C 30 menit, RT : 95°C 15 menit 35 cycle : 94°C 30 detik, 57°C 1 menit, 72°C 1 menit, Final elongasi 72°C 10 menit. **Elektroforesis** menggunakan mesin Mupid 2, 100 volt selama 40 menit, DNA *Ladder* 100 bp, buffer TAE 1x, agarose 2%, *loading dye*, dan *SYBR Safe*. Pembacaan hasil elektroforesis menggunakan mesin *safe imager*.

Metode DNA Sequencing

Isolat yang menunjukkan hasil positif pada uji PCR dengan pita ampikon *single* selanjutnya akan dipurifikasi menggunakan *Illustra Exostar Kit*, setelah DNA dipurifikasi maka dilakukan penghitungan konsentrasi DNA dan tingkat kemurniannya menggunakan mesin NanoDrop (Thermo - USA, Nanodrop 2000).

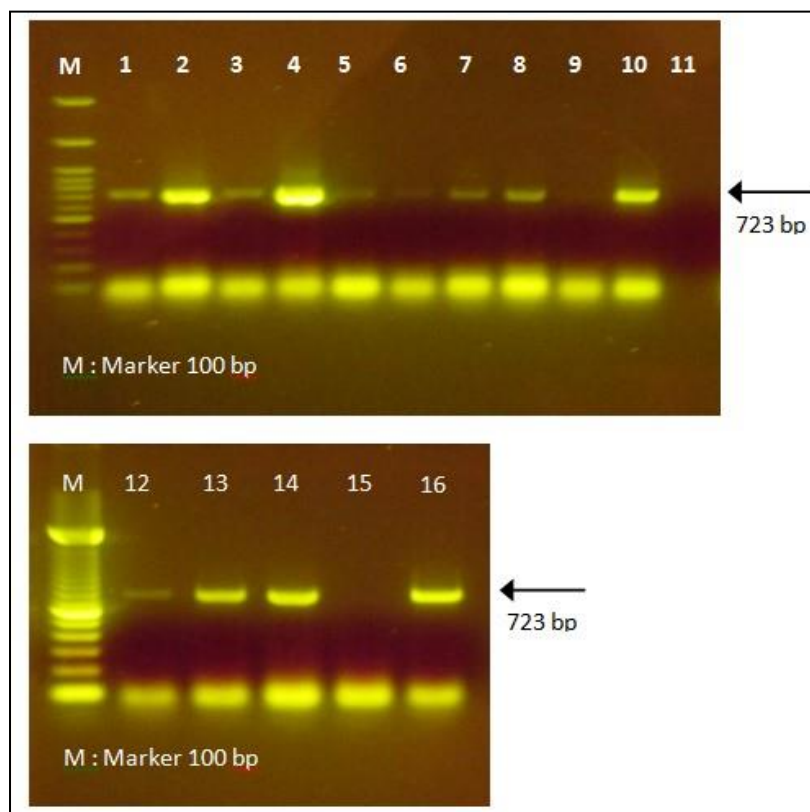
Setelah diperoleh konsentrasi DNA, dilakukan pengenceran DNA sesuai dengan target panjang ampikon yang diinginkan menggunakan RT PCR *Grade Water*. Target panjang nukleotida IBD gen glikoprotein PV2 adalah 723 bp, untuk panjang nukleotida sampai 1000 dibutuhkan konsentrasi DNA $\pm 10 - 20$ ng/µL. Tahap selanjutnya pengujian *Cycle Sequencing* menggunakan *Bigdye Terminator Cycle Sequencing Kit* dan primer yang digunakan pada PCR tahap II. Reagent yang digunakan pada master mix untuk *Cycle Sequencing* adalah *Bigdye Terminator* 2 µL, *Buffer sequencing* 2 µL, Primer PV2 forward / PV2_Reverse (20 µM) 2 µL, RT_PCR *Grade Water* 3.5 µL, DNA setelah diencerkan 1.5 µL. Tahap *thermocycler* : Hot start 96 °C 1 menit, 25 cycle : 96 °C 10 detik, 50 °C 5 detik, 60 °C 4 menit.

Produk hasil *cycle sequencing* dipurifikasi menggunakan *Big Dye X-Terminator Kit* dengan perbandingan 10 µL produk hasil *cycle sequencing* ditambah 45 µL *SAM Solution* dan 11 µL *Big Dye X-Terminator Kit* yang dimasukkan dalam satu tube divortex selama 30 menit. Selesai divortex, tube yang berisi sampel dan larutan purifikasi dispin dan diambil bagian supernatan. 10 µL produk hasil purifikasi *Bigdye X-Terminator* dimasukkan ke dalam plate 96 *well* kemudian ditutup dengan septa *well* dan dimasukkan

dalam sampel *retainer*. Selanjutnya dilakukan pemasangan *buffer* katoda, anoda serta polymer POP 7 yang belum kedaluarsa. *Running* Elektroforesis *Genetic Analyzer* menggunakan *capillary array* 50 cm 8 kapiler, protokol : Std_Seq_Assay_POP7_Z selama $\pm$ 2 jam 16 menit. Perangkat lunak yang digunakan adalah software *Sequencing Analysis*, *Seqscape*, NCBI (BLAST) dan MEGA5.

HASIL PCR DAN SEQUENCING

Hasil PCR



Tabel 3. Hasil Uji PCR

No.	Kode Sampel	Panjang Pita Amplikon	Intensitas Pita Amplikon	Kesimpulan Hasil PCR
1	PV-0012015	723 bp	Sedang	Positif IBDV
2	PV-0032015	723 bp	Kuat	Positif IBDV
3	PV-0052015	723 bp	Sedang	Positif IBDV
4	PV-0092015	723 bp	Kuat	Positif IBDV
5	PV-0022015	723 bp	Sedang	Positif IBDV
6	PV-0042015	723 bp	Lemah	Positif IBDV
7	PV-0072015	723 bp	Sedang	Positif IBDV
8	PV-0132015	723 bp	Sedang	Positif IBDV
9	PV-0142015	723 bp	Lemah	Positif IBDV

10	Kontrol Positif Leukert	723 bp	Kuat	Positif IBDV
11	Kontrol Negatif	Negatif	Negatif	Negatif IBDV
12	PV-0062015	723 bp	Sedang	Positif IBDV
13	PV-0082015	723 bp	Kuat	Positif IBDV
14	PV-0102015	723 bp	Kuat	Positif IBDV
15	PV-0112015	Negatif	Negatif	Negatif IBDV
16	PV-0122015	723 bp	Kuat	Positif IBDV

Tabel 3 menampilkan hasil pengujian PCR 14 sampel virus vaksin IBDV yang telah ditumbuhkan pada telur embrio tertunas (TET) dan diperoleh hasil positif untuk semua sampel kecuali sampel PV-0112015. Hasil PCR positif ditandai adanya pita amplikon dengan panjang 723 bp sesuai dengan target primer PV2 yang digunakan. Pita amplikon yang dihasilkan memiliki intensitas lemah, sedang dan kuat tergantung jumlah DNA virus IBDV yang teramplifikasi.

Dalam pelaksanaan pengujian PCR untuk menjaga mutu dan validitas pengujian digunakan kontrol positif dan kontrol negatif. Hasil uji PCR kontrol positif adalah positif dengan diperoleh pita amplikon 723 bp sesuai dengan target primer PV2, sedangkan kontrol negatif hasil PCR negatif yaitu tidak ditemukan pita amplikon DNA virus IBDV.

Hasil Sequencing

Tabel 4. Hasil Analisa Residu Asam Amino Gen PV2

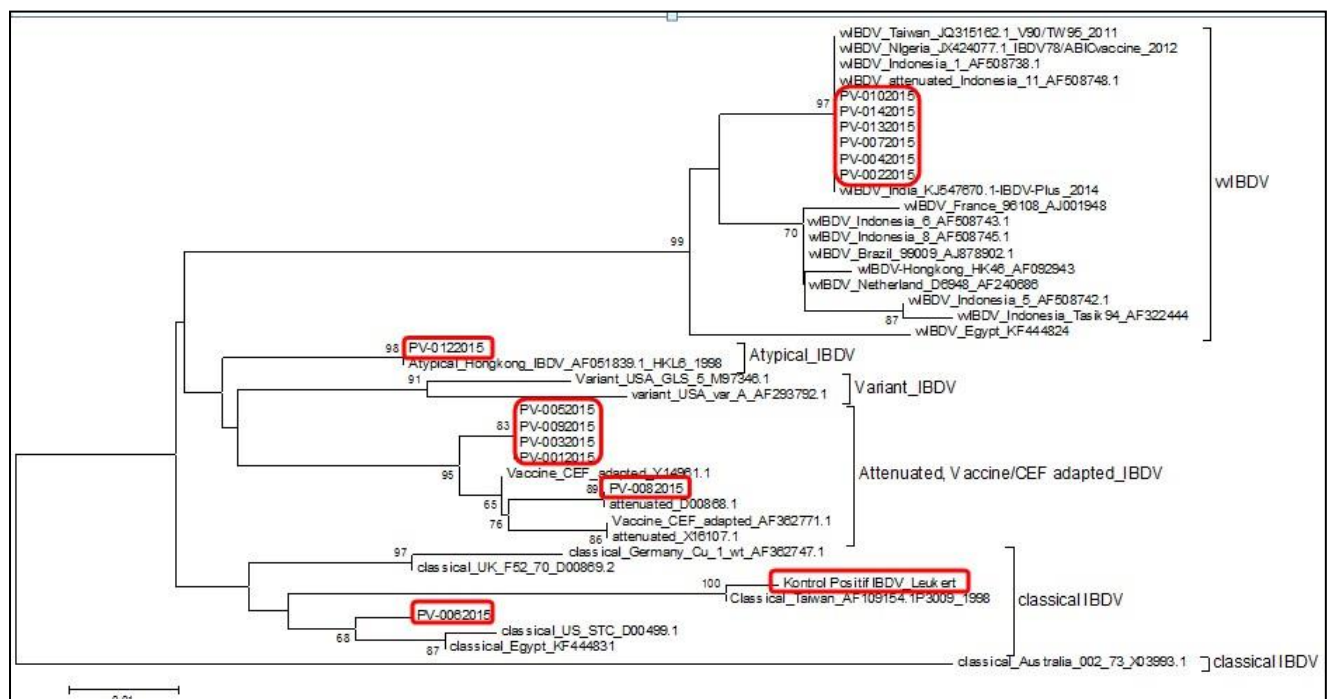
No.	Sampel/Acc.No.Ref	222	253	256	272	279	284	294	299	Kesimpulan Pathotype
1	Ref Y14961.1	A	Q	I	T	N	A	I	S	<u>vvIBDV</u>
2	Ref D00499.1	P	Q	V	I	D	A	L	N	<u>Classical</u>
3	Ref AF109154.1	S	H	A	I	D	T	L	N	<u>Classical</u>
4	Ref AF051839.1	S	Q	I	I	N	A	L	N	<u>Atypical</u>
5	Ref D00868.1	P	H	V	I	N	T	L	N	<u>Attenuated</u>
6	Ref AF508738.1	P	H	V	I	N	T	L	N	<u>Vaccine/CEF adapted</u>
7	Ref M97346.1	T	H	V	I	N	T	L	N	<u>Variant</u>
8	PV-0012015	P	H	V	I	N	T	L	N	<u>Attenuated-Vaccine/CEF adapted</u>
9	PV-0032015	P	H	V	I	N	T	L	N	<u>Attenuated-Vaccine/CEF adapted</u>
10	PV-0052015	P	H	V	I	N	T	L	N	<u>Attenuated-Vaccine/CEF adapted</u>
11	PV-0092015	P	H	V	I	N	T	L	N	<u>Attenuated-Vaccine/CEF adapted</u>
12	PV-0022015	P	Q	I	T	N	A	I	S	<u>vvIBDV</u>
13	PV-0042015	A	Q	I	T	N	A	I	S	<u>vvIBDV</u>
14	PV-0072015	A	Q	I	T	N	A	I	S	<u>vvIBDV</u>
15	PV-0132015	A	Q	I	T	N	A	I	S	<u>vvIBDV</u>
16	PV-0142015	A	Q	I	T	N	A	I	S	<u>vvIBDV</u>
17	PV-0062015	P	Q	V	I	D	A	I	N	<u>Classical</u>
18	PV-0082015	P	H	V	I	N	T	L	N	<u>Attenuated-Vaccine/CEF adapted</u>
19	PV-0102015	A	Q	I	T	N	A	I	S	<u>vvIBDV</u>
20	PV-0112015	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>Hasil PCR & Sequencing: Negatif</u>
21	PV-0122015	S	Q	I	I	N	A	L	N	<u>Atypical</u>
22	Kontrol Positif IBDV	S	H	A	I	D	T	L	N	<u>Classical</u>

Dalam tabel 4 ditampilkan residu asam amino *reference* IBDV untuk *pathotype* *vvIBDV*, *classical*, *attenuated/vaccine_CEF adapted*, *variant* dan *atypical* IBDV pada posisi asam amino nomor 222, 242, 253, 256, 272, 284, 294 dan 299. Residu asam amino tersebut

dibandingkan dengan asam amino sampel virus vaksin IBD yang telah *disequencing*. Dari tabel 4 terlihat sampel PV-001, 003, 005, 008, 009 memiliki residu asam amino yang sama dengan *reference* IBDV Attenuated (D00868.1) dan *vaccine/CEF adapted* (AF508738.1) yaitu 222P, 256V, 294L, dan 299N.

Sampel PV-002, 004, 007, 010, 013, 014 memiliki residu asam amino yang sama dengan *reference* IBDV vvIBDV (Y14961.1) yaitu 222A, 256I, 294I dan 299S. Untuk sampel PV-0122015 residu asam amino sama dengan *reference atypical* IBDV (AF051839.1) : 222S, 256I, 294L, dan 299N. Sampel PV-0062015 memiliki residu asam amino yang sama dengan *reference classical* IBDV (D00499.1) : 222P, 256V, 294I, dan 299N sedangkan kontrol positif IBD (Leukert) residu asam amino sama dengan *reference classical* IBDV (AF109154.1) : 222S, 256A, 294L, dan 299N.

Adanya persamaan residu asam amino di atas dapat dinyatakan bahwa sampel PV-001, 003, 005, 008, 009 termasuk dalam *pathotype attenuated/vaccine_CEF adapted*, sampel PV-002, 004, 007, 010, 013, 014 termasuk *pathotype vvIBDV*, PV-0122015 termasuk *pathotype atypical* IBDV, sedangkan PV-0082015 dan kontrol positif IBDV termasuk *pathotype classical* IBDV.



Gambar 1. Hasil Analisa Pohon *Phylogenetik*

catatan: sampel vaksin virus IBDV pada pohon phylogentik diberi tanda kotak garis merah.

Gambar 1. Analisa pohon phylogentik metode Neighbour-joining tree bootstrap 1000 replikasi melihat jarak evolusi sampel virus vaksin terhadap reference sequen beberapa pathotype IBDV. Kode sampel virus vaksin, strain dan accession number reference sequen IBDV berikut: V90/95 (JQ315162.1), IBDV78/ABICvaccine (JX424077.1), Indonesia-1 (AF508738.1), Indonesia-11 (AF508748.1), PV-0102015, PV-0142015, PV-0132015, PV-0072015, PV-0042015, PV-0022015, IBDV-Plus (KJ547670.1), 96108 (AJ001948), Indonesia-6 (AF508743.1), Indonesia-8 (AF508745.1), 99009 (AJ878902.1), HK46 (AF092943), D6948 (AF240686), Indonesia-5 (AF508742.1), Tasik94 (AF322444), KF444824, HKL6 (AF051839.1), GLS5 (M97346.1), VarA (AF293792.1), PV-0052015, PV-0092015, PV-0032015, PV-0012015, CT (Y14961.1), PV-0082015, PBG98 (D00868.1), Cu-1M (AF362771.1), Cu-1 (X16107), Cu1 wt (AF362747.1), F5270 (D00869.2), Kontrol positif IBD Leukert, P3009 (AF109154), PV-0062015, STC (D00499.1), KF444831, 002073 (X03993.1).

Hasil analisa pohon *phylogenetic* pada gambar 1 di atas menunjukkan bahwa sampel PV-0022015, PV-0042015, PV-0072015, PV-0102015, PV-0132015 dan PV-0142015 terdapat dalam satu cabang (*sub kluster*) kelompok *pathotype* vvIBDV, dan memiliki kedekatan evolusi dengan kelompok vvIBDV isolat vvIBDV *attenuated* Indonesia, isolat Indonesia-1, vvIBDV dari Taiwan, Nigeria dan India. Sedangkan terhadap *pathotype* vvIBDV isolat lain berbeda cabang namun masih dalam satu *kluster pathotype* vvIBDV.

Sampel PV-0122015 berada dalam satu cabang dengan *reference pathotype atypical* IBDV namun tidak dalam satu cabang dengan *reference pathotype variant* (Acc. No. M97346.1 dan AF293792.1). Sampel PV-0012015, PV-0032015, PV-0052015, PV-0082015 dan PV-0092015 terdapat dalam satu cabang yang sama dengan *reference pathotype attenuated* dan *vaccine/CEP adapted*. Sedangkan sampel PV-0082015 terletak dalam satu *kluster pathotype classical* yang terdekat dengan *accession number* D00498.1 dan KF444831, untuk sampel kontrol positif juga termasuk dalam *pathotype classical* yang terdekat dengan *strain* P3009 *accession number* AF109154.1 namun untuk *reference pathotype classical* dari Australia yaitu *strain* 002/73 *accession number* X03993.1 telah membentuk cabang tersendiri dan terpisah jauh.

PEMBAHASAN

Polymerase Chain Reaction (PCR)

14 sampel virus vaksin IBDV yang telah dipasase di TET diuji PCR dan diperoleh hasil semua sampel positif kecuali sampel PV-0112015. Beragamnya intensitas pita amplikon DNA yang diperoleh yaitu lemah, sedang dan kuat kemungkinan disebabkan karena setiap virus memiliki kemampuan berbeda –beda saat kembali ditumbuhkan atau dipasase. Virus yang diperoleh jumlahnya beragam dan kemurniannya berbeda. Untuk sampel PV-0112015 mungkin pada awal *pasase* jumlah virus masih sangat sedikit, saat diekstraksi jumlah RNA yang diperoleh juga sedikit sehingga diperoleh hasil PCR yang negatif yaitu tidak ada DNA virus IBDV yang teramplifikasi.

Ahmad *et al* menyimpulkan suatu studi terhadap isolat lokal IBDV yang secara lengkap diadaptasikan dan diatenuasi pada telur ayam berembrio. Pada awal *pasase* di *chorio allantoic fluid* (CAF) diperoleh titer virus yang masih rendah namun titer virus akan terus meningkat setelah terus dilakukan *pasase*. Sedangkan lesio pada *chorio allantoic membrane* (CAM) dan embrio pada awal *pasase* terlihat parah tapi tingkat keparahan ini terus menurun seiring meningkatnya jumlah *pasase* ⁽²⁾. *Pathotype* vvIBDV tidak mampu dipropagasi langsung di sel kultur dan attenuasi melalui pengulangan *pasase* vvIBDV di *chicken embryo fibroblast* ⁽³⁴⁾ dan *vero cell* ⁽²⁰⁾ dibutuhkan adaptasi untuk ditumbuhkan di *tissue culture*.

Sampel kontrol positif diperoleh hasil positif yaitu diperoleh pita amplikon 723 bp, hasil positif ini merupakan tanda bahwa tahap pengerjaan ekstraksi hingga amplifikasi DNA berjalan baik dan pada tahap amplifikasi tidak terdapat *inhibitor* dalam proses amplifikasi DNA sehingga diperoleh panjang amplikon DNA yang sesuai dengan target primer gen PV2. Untuk kontrol negatif hasilnya adalah negatif artinya tahap ekstraksi hingga amplifikasi dilakukan dengan benar dan bersih sehingga tidak ada kontaminasi.

Analisa Residu Asam Amino Gen PV2

Karakterisasi molekular pada daerah variable VP2 pada beberapa asam amino (aa) yang menandai patogenitas virus IBDV merupakan daerah yang sangat tinggi terjadi mutasi dan dapat digunakan untuk identifikasi unik *variant*, *classical*, dan vvIBDV. Mutasi pada daerah *hydrophilic* penting untuk dikaji untuk mengetahui kemampuan virus terlepas dari antibodi netralisasi. Mutasi dalam bentuk substitusi residu asam amino pada puncak *hydrophilic* dapat menghasilkan *variant strain* ⁽¹²⁾. Adanya *variant* antigenik dan vvIBDV yang telah menyebabkan kerugian besar dalam industri perunggasan, dengan munculnya

strain baru yang mampu bermutasi tinggi menyebabkan viral RNA *polymerase* kurang mampu mengenali strain baru dan menghasilkan banyaknya diversifikasi ⁽²²⁾.

Dalam kajian ini, enam sampel virus vaksin IBDV (PV-002, 004, 007, 010, 013, 014) memiliki residu asam amino yang sama dengan *reference* vvIBDV yaitu 222A, 256I, 294I, 299S. Menurut *Rudd et al*, terdapat empat posisi asam amino yang *conserve* yaitu *alanin* pada posisi aa 222 (A222), *isoleusin* aa 256 (I256), *isoleusin* aa 294 (I294) dan *serine* aa 299 (S299) untuk *pathotype* vvIBDV ⁽²⁷⁾. Posisi aa tersebut telah digunakan sebagai target beberapa molekular atau uji antigenik yang bertujuan untuk analisa molekular atau identifikasi antigenik vvIBDV ^(7,36). Dari kajian di atas dapat disimpulkan bahwa sampel virus vaksin PV-002, 004, 007, 010, 013, 014 termasuk *pathotype* vvIBDV.

Suatu studi vvIBDV dari Indonesia menghasilkan aa posisi 222 sebagai alanine bukanlah karakter unik karena beberapa isolat tersebut mengalami mutasi substitusi yaitu dari alanine menjadi serine ⁽²⁶⁾. Namun hal ini tidak terjadi pada sampel virus vaksin IBDV yang termasuk *pathotype* vvIBDV karena pada posisi aa 222 tetap *alanine*. Terdapat juga kajian virus IBDV dari Malaysia yaitu A222, I242, I256, I294 dan S299 yang merupakan karakter genetik vvIBDV namun hanya menyebabkan kematian 10% pada ayam karena virus tersebut telah mutasi substitusi dari *glycine* menjadi *serin* pada posisi aa 254 (G254S) dan *alanin* menjadi *glutamic acid* pada posisi aa 270 (A270E) ⁽¹³⁾.

Hasil analisa residu aa posisi 222, 256, 294 dan 299 menyimpulkan sampel virus vaksin PV-002, 004, 007, 010, 013, 014 termasuk *pathotype* vvIBDV. Suatu studi yang dilakukan Brandt dan Islam, residu asam amino yang ditemukan pada posisi 253 dan 284 bertanggung jawab terhadap patogenesitas dan keunikan virulensi tinggi vvIBDV ⁽⁵⁾. Sampel virus vaksin PV-002, 004, 007, 010, 013, 014 memiliki aa *glutamine* (Q) pada posisi 253 dan namun memiliki aa alanin pada posisi 284. Melalui adaptasi pada sel kultur dapat dihasilkan mutasi substitusi aa posisi 253 dari *glutamine* (Q) menjadi *histidine* (H) dan aa posisi 284 dari *alanine* menjadi *threonine* (T) yang merupakan ciri spesifik aa untuk sel tropis ⁽³⁶⁾. *Strain* yang memiliki *glutamine* (Q) pada posisi 253 menjadi tinggi patogenitasnya daripada *histidine* (H) yang lebih kurang patogenik. Mutasi aa H menjadi Q terlihat pada peningkatan virulensi dari attenuasi virus ⁽¹⁹⁾.

Hasil analisa residu aa posisi 272 dan 279 untuk sampel virus vaksin PV-002, 004, 007, 010, 013, 014 *pathotype* vvIBDV diperoleh hasil *threonine* (T) dan *asparagine* (N).

Residu aa pada posisi 272 dan 279 untuk *pathotype* vvIBDV merupakan keunikan tersendiri yang membedakan terhadap *pathotype* vvIBDV yang lainnya yaitu mutasi substitusi aa 272 dari *isoleucin* (I) menjadi *threonine* (T) dan aa 279 dari *aspartic acid* (D) menjadi *asparigine* (N), karakter ini tidak menyebabkan adanya gejala klinis atau mortalitas sebagaimana karakteristik *pathotype* vvIBDV ⁽²⁶⁾.

Selanjutnya lima sampel virus vaksin (PV-001, 003, 005, 009 dan 008) memiliki residu yang sama dengan *reference attenuated-Vaccine/CEF adapted* (Acc.No. D00868.1 dan AF508738.1). Vaksin *classical attenuated* IBDV dapat melindungi ayam dari infeksi *pathotype* vvIBDV, namun sebagaimana ciri khas vvIBDV adalah tetap mampu menyebabkan penyakit gumboro walaupun terdapat tingkat antibodi netralisasi yang lebih tinggi dibandingkan *classical virulent* IBDV. Karena itu tingginya *attenuated* suatu vaksin akan menyebabkan tingkat antibodi netralisasi lebih rendah dalam tubuh ayam sehingga tidak memberikan perlindungan yang cukup terhadap vvIBDV ⁽⁷⁾.

Strain IBDV memperlihatkan pengurangan virulensi setelah mengalami *pasase* di telur berembrio ⁽¹⁾, dan *chicken embryo fibroblast* ⁽³⁵⁾. Sebagian besar *wild type* IBDV yang diperoleh dari *bursa fabricius* yang *recovery* tidak mengalami replikasi di CEF sel ⁽²⁴⁾. Virus akan menjadi progresif beradaptasi untuk tumbuh secara *in vitro* dan *pasase* virus IBDV secara *in vitro* yang dihubungkan dengan attenuasi virulensi, membuktikan terjadi suatu pengurangan kemampuan untuk menyebabkan lesio pada bursa ⁽¹⁰⁾. Sedangkan *pasase* secara *in vitro* menggunakan telur ayam berembrio merupakan pendekatan yang tepat untuk mengembangkan *attenuated live* vaksin ⁽³⁴⁾.

Analisa Pohon Phylogenetik

Nukleotida hasil *sequencing* dari sampel virus vaksin target gen PV2 dengan menggunakan *tools search BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) untuk mengidentifikasi sampel virus vaksin yang memiliki homologi tertinggi dalam *reference sequen* yang terdapat dalam *database genbank*. *Sequen* nukleotida sampel virus vaksin dibandingkan dengan berbagai *pathotype* virus IBDV dari beberapa negara yang dapat diakses di *Genbank* dengan *ClusthalW method* dan memperhatikan jarak gentik (*genetic distance*) terhadap *reference sequen* menggunakan *software* MEGA5. Masing – masing *sequen* sampel virus vaksin dan *reference sequen* disejajarkan dengan mengelompokkan

sequen menjadi sub-kelompok dan selanjutnya kelompok besar, dengan menghitung jarak antar *sequen* secara berpasangan.

Dari hasil analisa pohon phylogenetik terlihat bahwa sampel vaksin virus PV-002, 004, 007, 010, 013 dan 014 secara genetik sangat dekat dan berada dalam satu kluster dengan *reference sequen pathotype* vvIBDV negara Taiwan, Nigeria dan satu isolat dari Indonesia serta satu isolat vvIBDV *attenuated* dari Indonesia. Sedangkan kluster vvIBDV yang membentuk cabang terpisah walaupun masih dalam satu kluster besar vvIBDV yaitu vvIBDV Prancis, 4 isolat vvIBD dari Indonesia, Hongkong, Brazil, Belanda dan Egypt. Walaupun terbentuk dua kluster vvIBDV namun masih membentuk satu kelompok genetik dan tampak memiliki sumber asal virus yang sama (*common ancestor*). Kenyataan ini mendukung kajian Zierrenberg bahwa wabah-wabah IBD yang baru terjadi akhir dekade 1990-an dari Eropa, Afrika dan Asia berasal dari galur-galur virus IBD yang berhubungan satu sama lainnya ⁽³⁶⁾.

Reference pathotype classical Australia yaitu *strain* 002/73 *accession number* X03993.1 telah membentuk cabang tersendiri dan terpisah jauh, hal ini dapat disebabkan bagian kluster secara geografi seperti beberapa studi terhadap isolat Australia IBDV telah memperlihatkan posisi tersendiri yang dimungkinkan karena geografi yang terisolasi dari Benua Australia ⁽¹⁴⁾.

Hasil karakterisasi secara molekuler *pathotype* virus vaksin yang digunakan di Indonesia cukup beragam yaitu vvIBDV, *atypical*, *classical* dan *attenuated-vaccine CEF adapted*. Sampel virus vaksin *pathotype* vvIBDV memang masih memiliki kedekatan genetik dengan dua isolat dari Indonesia (Indonesia-1 dan Indonesia-11), namun berbeda cabang dengan 4 isolat Indonesia lainnya (Indonesia-5, 6, 8 dan Tasik94) walaupun masih dalam kluster vvIBDV namun terlihat jarak evolusi yang berbeda cabang. Sampel virus vaksin yang memiliki *pathotype atypical* memiliki genetik/jarak evolusi yang dekat dengan *pathotype atypical* dari Hongkong. Sampel virus vaksin yang memiliki *pathotype attenuated-vaccine CEF adapted* memiliki genetik yang dekat dengan isolat *pathotype attenuated-vaccine CEF adapted* dari Prancis, United Kingdom, dan Jerman. Sedangkan untuk sampel virus vaksin yang memiliki *pathotype classical* memiliki genetik yang dekat dengan *reference classical* dari Taiwan, Amerika dan Mesir.

Adanya program vaksinasi intensif yang dilakukan di lapangan menggunakan *live attenuated* virus dapat memungkinkan terjadinya mutasi pada virus dan mengubah potensi patogenitas virus sehingga diperlukan evaluasi suatu program vaksinasi ⁽³⁷⁾.

Keragaman genetik virus vaksin yang digunakan di lapangan dapat menyebabkan implikasi yang besar dalam keberhasilan program vaksinasi, karena itu perlu kajian terhadap isolat –isolat dari lapangan (Indonesia) yang terbaru untuk dikarakterisasi secara molekular dan imunologi sehingga bisa diperoleh potensi isolat untuk pembuatan vaksin. Diharapkan isolat vaksin yang digunakan dapat menghasilkan proteksi yang tinggi dan sesuai/ cocok dengan virus IBDV di lapangan.

KESIMPULAN

Metode PCR dan *sequencing* dengan target gen PV2 telah mampu mengidentifikasi *pathotype* virus vvIBDV secara akurat pada sampel virus vaksin bentuk kering beku yang telah ditumbuhkan di telur embrio tertunas. Vaksin virus IBDV yang beredar di Indonesia cukup beragam, terdapat beberapa *pathotype* virus IBDV yaitu vvIBDV (PV-002, 004, 007, 010, 013, 014), *classical* (PV-006 dan kontrol positif IBDV), *atypical* (PV-0122015) dan *attenuated-vaccine/CEF adapted* (PV-001, 003, 005, 009, 008) berdasarkan analisa residu asam amino, homologi nukleotida dan pohon phylogentik yang dibandingkan dengan *reference* virus IBDV yang terdapat dalam *database genebank*.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Abdel-Alim G. A. and Y. M. Saif.** 2002. Pathogenicity of embryo adapted serotype 2 OH strain of infectious bursal disease virus in chickens and turkeys. *Avian Dis.*, 46: 1001-1006.
2. **Ahmad, A. N., Hussain, I., Siddique, M., Mahmood, M. S.** 2005. Adaptation of indigenous infectious bursal disease virus (IBDV) in embryonated chicken eggs. *Pakistan Vet. J.*, 25 (2): 2005.
3. **Benton, W. J., Cover, M. S., and Rosenberger, J. K.** 1967. Studied on the transmission of the infectious bursal agent of chickens. *Avian Diseases* 11:430-438.
4. **Birnaviridae. In: Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ.** *Veterinary Virology*. Orlando: Academic Press; 1999. p. 405–9.

5. **Brandt M, Yao K, Liu M, Heckert RA, Vakharia VN.** 2001. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J Virol* 2001;75:11974–82.
6. **Butcher, G. D., and Miles, R. D.** 1995. Infectious bursal disease in commercial broilers, University of Florida.
7. **Eterradossi, N., Arnauld, C., Toquin, D., Rivallan, G.** 1998. Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Archives of Virology* 143, 1627–1636.
8. **Gomes, A. D., J. T. Abreu, R. A. F. Redondo, N. R. S. Martins, J. s. Resende. & M. Resende.** 2005. Genotyping of infectious bursal disease virus strains by restriction fragment length polymorphism analysis of the VP1, VP2, and VP3 genes. *Avian Dis.* 49:500-506.
9. **Gomma, A., Abdel-Alim, M., H. H. Awaad, and Y. M. Saif.** 2003. Characterization of Egyptian field strains of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 47:1452-1457.
10. **Hassan, M. K. & Y. M. Saif.** 1996. Influence of the host system on the pathogenicity and immunogenicity of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, 40: 553-561.
11. **Hassan, M. K.** 2004. Very virulent infectious bursal disease virus in Egypt : epidemiology, isolation and immunogenicity of classical vaccine. *Vet. Res. Commun.* 28:347-356.
12. **Heine, H.G., Haritou, M., Failla, P., Fahey, K., Azad, A.** 1991. Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains. *J. Gen. Virol.* 72, 1835 1843.
13. **Hoque, M.M., Omar, A.R., Chong, L.K., Hair-Bejo, M., Aini, I.** 2001. Pathogenicity of SspI-positive infectious bursal disease virus and molecular characterization of the VP2 hypervariable region. *Avian Pathol.* 30, 369–380.
14. **Ignjatovic, J. & Sapats, S.** 2002. Confirmation of the existence of two distinct genetic groups of infectious bursal disease virus in Australia. *Aust Vet J* 80, 689–694.
15. **Ismail, N.M., Saif, Y.M.** 1991. Immunogenicity of infectious bursal disease viruses in chickens. *Avian Dis.* 35, 460–469.
16. **Islam MR, Zierenberg K, Eterradossi N, Toquin D, Rivallan G, Muller H.** 2001. Molecular and antigenic characterization of Bangladeshi isolates of infectious bursal

disease virus demonstrate their similarities with recent European, Asian and African very virulent strains. *J Vet Med B*;48:211–21.

17. **Jackwood, D. J. & S. E. Sommer.** 1997. Restriction fragment length polymorphism in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 41:627-637.
18. **Jackwood, D. J. & S. E. Sommer.** 1999. Restriction fragment length polymorphism in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States. *Avian Dis.* 43:310-314.
19. **Jackwood, D.J., Sreedevi, B., LeFever, L.J., Sommer-Wagner, S.E.** 2008. Studies on naturally occurring infectious bursal disease viruses suggest that a single amino acid substitution at position 253 in VP2 increases pathogenicity. *Virology* 377, 110–116.
20. **Kwon, H.M., Kim, D.K., Hahn, T.W., Han, J.H., Jackwood, D.J.** 2000. Sequence of precursor polyprotein gene (segment A) of infectious bursal disease viruses isolated in Korea. *Avian Dis.* 44, 691–696.
21. **Lin, Z., Kato, A., Otaki, Y., Nakamura, T., Sasmaz, E., Ueda, S.** 1993. Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis.* 37, 315–323.
22. **Luckert, P.D. & Y. M. Saif.** 2003. Infectious bursal disease. In : *Diseases of poultry*, 11th ed. Y. M. Saif, H.J.R. Gilson, A. Fadly, L.R. McDougald, and D. F. Swayne, eds. Iowa State University Press, Ames, IA. Pp.161-180.
23. **Mardassi, H., N. Khabouchi, A. Ghram, A. Namouchi, & A. Karboul.** 2004. A very virulent genotype of infectious bursal disease virus predominantly associated with recurrent infectious bursal disease outbreaks in Tunisian vaccinated flocks. *Avian Dis.* 48 : 829-840.
24. **McFerran, J.B., McNulty, M.S., McKillop, E.R., Connor, T.J., McCracken, R.M., Collins, D.S., Allan, G.M.** 1980. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. *Avian Pathol.* 9, 395–404.
25. **Muller, H., Islam, M.R., Raue, R.** 2003. Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future. *Vet. Microbiol.* 97, 153–165.
26. **Parede, L., Sapats, S.I., Gould, G., Rudd, M.F., Lowther, S., Ignjatovic, J.** 2003. Characterization of infectious bursal disease virus isolates from Indonesia indicates the existence of very virulent strains with unique genetic changes. *Avian Pathol.* 32, 511–518.

27. **Rudd, M.F., Heine, H.G., Sapats, S.I., Parede, L., Ignjatovic, J.** 2002. Characterization of an Indonesian very virulent strain of infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 147, 1303–1322.
28. **Sapats, S. I., Trinidad, L., Gould, G., Heine, H. G., van den Berg, T. P., Eterradossi, N., Jackwood, D., Parede, L., Toquin, D., Ignjatovic, J.** 2006. Chicken recombinant antibodies specific for very virulent infectious bursal disease virus. *Archives of Virology* 151 : 1551-1566.
29. **Tabbu, C. R.** 2000. Penyakit ayam dan penanggulangannya. Volume 2. Penerbit Kanisius.
30. **Van den Berg, T.P., Eterradossi, N., Toquin, D., Meulemans, G.** 2000. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev. Sci. Tech.* 19, 509–543.
31. **Vindevogel, H, Gouffaux, M., Meulemans, G., Duchatel, J.P., Helen, P.** 1976. Infectious bursal disease: distribution and persistence of the virus in inoculated chickens. Study on the transmission of the disease. *Avian Pathology.* 5(1):31-38. French.
32. **Wang, X. M., X. W. Zeng, H. L. Gao, C. Y. Fu, & P. Wei.** 2004. Changes in PV2 gene during the attenuation of very virulent infectious bursal disease virus strain Gx isolated in China. *Avian Dis.* 48 : 77-83.
33. **Wei, Y., J. Li, J. Zheng, H. Xu, L. Li, & L. Yu.** 2006. Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350 : 277-287.
34. **Yamaguchi, T., Ogawa, M., Inoshima, Y., Miyoshi, M., Fukushi, H., Hirai, K.,** 1996b. Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus. *Virology* 223, 219–223.
35. **Yamaguchi, T., A. Setiyono, M. Kobayashi, S. Takigami, H. Fukushi, and K. Hirai.** 2000. Infectious bursal disease live vaccines: Changes in the virus population during serial passage in chickens and chicken embryo fibroblast cells. *Avian Dis.*, 44: 284-290.
36. **Zierenberg K, Nieper H, van den Berg TP, Ezeokoli CD, Voß M, Müller H.** 2000. The VP2 variable region of African and German isolates of infectious bursal disease virus: comparison with very virulent, “classical” virulent, and attenuated tissue culture adapted strains. *Arch Virol* 145:113–25.
37. **Zierenberg K, Raue R, Müller H.** 2001. Rapid identification of “very virulent” strains of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis. *Avian Pathol* 30:55–6.

