

Detection of Antibodies to Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) by Agar Gel Immunodiffusion using Recombinant VP2 Protein

Woo-Jin Jeon¹, Byung-Sik Chang², Eun-Kyoung Lee¹, Mi-Ja Park¹, Hoo-Don Joo²,
Jun-Hun Kwon¹ and Kang-Seuk Choi^{1*}

¹National Veterinary Research Institute, National Veterinary Research and Quarantine Service Anyang, Gyeonggi, Republic of Korea; ²JenoBiotech Inc, Chuncheon, Gangwon, Republic of Korea

Received : June 16, 2008

Revised : August 25, 2008

Accepted : September 2, 2008

Infectious bursal disease virus (IBDV) causes a highly contagious and immunosuppressive disease of chicken. Agar gel immunodiffusion using IBDV antigen extracted from bursa of Fabricius of infected chicken has been used officially for diagnosis of IBDV in Korea. In this study, in order to replace the IBDV whole virus antigen with non-infectious antigen, recombinant VP2 protein (rVP2) of IBDV was produced using recombinant baculovirus expression system. Purified baculovirus-expressed rVP2 was used as an antigen in an agar gel immunodiffusion (AGID). rVP2 antigen precipitated specifically IBDV antibodies. AGID using rVP2 antigen detected anti-IBDV antibodies from 6 dpi to 28 dpi (termination of the experiment) when specific pathogen free chickens were experimentally infected with IBDV 52/70 strain. This was consistent with result by AGID using IBDV antigen, virus neutralization test (VNT) and a commercial ELISA kit (except for one serum). The sensitivity of rVP2 was the same with that of IBDV antigen when field sera (n=324) were tested by AGID. However, AGID using rVP2 antigen detected maternal antibodies from broiler chickens (n=20) on a broiler farm up to 15 days old, although the detection rate of the AGID was relatively low compared to a commercial ELISA kit. Our results indicate that IBDV whole virus antigen from IBDV infected chickens would be replaced with recombinant VP2 protein as an antigen for AGID.

Key Words: AGID, Antibody detection, Infectious bursal disease, VP2

서 론

닭전염성F낭병 (infectious bursal disease, IBD)은 닭의 대표적인 면역억제성 전염병중 하나이다. 어린 연령 (3주령 이전)의 병아리에 감염될 경우 폐사율은 낮지만 F낭 (bursa of Fabricius)의 미성숙 B세포를 파괴시킴으로서 심

한 면역억제를 유발하여 다른 질병에 대한 피해를 증가시키고 다른 예방백신의 백신효과를 감소시킬 수 있다. 또한, 3주령 내지 6주령의 닭에 감염될 경우 병의 경과가 매우 빨라 감염 3일 내지 4일에 급격한 폐사를 유발한다 (18,27).

이 질병의 병인체는 *Birnaviridae*과 *Avibirnavirus*속에 속하는 전염성F낭병 바이러스 (infectious bursal disease virus, IBDV)이다. IBDV genome은 이중나선 RNA (double stranded RNA) 형태로 두 개의 segments (segment A와 segment B)로 구성되어 있다 (2,5). Segment A (약 3.3 kb)는 일부 부위가 서로 overlap되는 두 개의 ORF로 구성되어 있는 반면, segment B는 약 2.9 kb 크기로 단일 ORF로 되어 있다. IBDV 구조단백질 VP2, VP3 및 VP4는 segment

*Corresponding author: Kang-Seuk Choi, DVM, MS, PhD. Veterinary Research Institute, National Veterinary Research & Quarantine Service 335 Jungang-ro, Manan-gu, Anyang-si, Gyeonggi 430-824, Republic of Korea.
Phone: +82-31-467-1821, Fax: +82-31-467-1814
e-mail: choiks@nvrqs.go.kr

**This work was supported by a grant (M-AD15-2007-07-01) from National Veterinary Research & Quarantine Service.

A (larger ORF)에 의해, IBDV 비구조단백질 VP1과 VP5는 segment A (smaller ORF) 및 segment B에 의해 각각 발현된다. 이중 VP2 단백질은 바이러스 입자 표면 외피를 구성하는 주요 캡시드 단백질로서 숙주에서 바이러스 중화항체반응을 유도하는 주된 구조단백질이다 (3,6,7).

현재까지 IBDV는 serotype I과 serotype II 두 가지의 혈청형이 존재하며, 그 중 serotype I만이 닭에서 병증을 유발한다 (11~13,20,24,27). IBDV serotype I은 독력과 항원성에 따라서 classical, very virulent, antigenic variant, intermediate plus, intermediate, mild phenotypes 등으로 분류된다 (28,29). 특히, very virulent type은 독력이 classical type에 비해 현격히 증가된 병원성 변이주로, 1986년 유럽에서 분리된 이후 다수의 유럽 및 아시아 등에서 닭에 큰 피해를 입히고 있는 실정이다 (18,27). 국내의 경우 1980년대 classical virulent IBDV (1), 1992년 닭에서 very virulent IBDV의 최초 발생이 보고된 바 있으며 (17), 현재까지도 IBDV, 특히 very virulent IBD는 국내 양계에서의 경제적 피해를 유발하는 주요 요인으로 작용하고 있다 (14~16). 어린 연령의 병아리에서 IBD 피해 예방을 위하여 종계면역 및 모체이행항체 소실 후 백신접종 전략을 사용하고 있다 (18,26).

현재 IBDV 항체를 검출하는 방법에는 virus neutralization test (VNT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), agar gel immunodiffusion (AGID) 등이 주로 사용되고 있다 (12,19). 이중 AGID는 고가의 실험장비나 고난도의 실험 기술 없이도 질병의 진단을 용이하게 할 수 있다는 장점이 있기 때문에 백신접종 또는 야외 감염 닭에서 IBDV 항체검출법으로 오랫동안 널리 사용되어 왔다 (4). 현재 AGID 진단액은 실험 감염 specific pathogen free (SPF) 닭의 F낭을 채취한 다음 유제 (homogenization) 하여 제조한 IBDV 항원 (조직유래항원, tissue-derived antigen)을 사용하고 있다 (9). 그러나 이러한 AGID 항원 생산은 SPF 닭을 사용하여 생산하므로 엄격한 동물실험 위생관리가 요구되고, 고가의 SPF 닭을 사용하므로 항원 제조 생산 단가가 높으며, 닭을 안락사시켜 F낭 조직을 채취하여 생물학적 안전 캐비닛 (class II safety cabinet)에서 항원을 제조하기 때문에 제조공정이 까다롭다. 또한, IBDV는 환경 저항성이 매우 강하므로 일단 동물사육시설에 오염될 경우 소독 조치를 실시하더라도 시설내 병원체를 완전히 제거하는 데 어려움이 있기 때문에 IBD 항원제조 용도 이외의 다른 실험 용도로 동물사육시설을

사용할 수 없다는 문제점이 있어 왔다. 또한, 동물보호법이 전면시행 (2008. 1. 27)됨에 따라 동물사용을 줄이거나 대체 가능한 *in vitro* 진단제 개발이 시급히 필요한 실정이다.

본 연구에서는 실험 감염 닭을 이용하여 IBDV 항원을 제조하는 종래의 방법을 개선하기 위하여 유전자 재조합 baculovirus를 이용하여 곤충세포에서 IBDV VP2 단백질을 인공적으로 생산하였다. 또한 인공합성 VP2 단백질 항원을 이용하여 AGID 진단항원으로서의 유효성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시 바이러스

본 연구를 위하여 IBDV는 52/70 strain (classical virulent type), P4 strain (classical virulent type), D78 strain (intermediate type) 및 국내 분리주 Kr/D62/06 strain (very virulent type)이 사용되었다. IBDV P4 strain은 Agri-Bio Corp (Spring, TX, USA)로부터, D78 strain은 Intervet사 (Boxmeer, The Netherlands)에서 구입하였으며, IBDV 52/70 strain은 Veterinary Laboratories Agency (VLA, Weybridge, UK)로부터 제공받았다. 중화시험에 이용되는 Edgar strain (classical virulent type)은 미국 National Veterinary Service Laboratories (NVSL, Ames, IA, USA)에서 제공받았다. 각 IBDV는 실험에 사용하기 전 10일령 SPF 발육 계란의 chorioallantoic membrane (CAM)에 계란당 0.1 ml씩 접종하여 37℃, 7일간 배양하고 4℃에서 chilling한 다음 CAM을 회수하였다. 회수된 CAM에 0.1 M PBS, pH 7.4를 첨가하여 동결 및 용해를 3회 반복하여 유제한 다음 3,000 × g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. IBDV 함유 상층액은 발육계란에서 endpoint titration으로 감염 역가를 측정하고, 실험에 사용하기 전까지 -70℃에 보관하였다.

2. AGID 진단액 IBDV 항원

AGID 진단액 표준 항원으로 국립수의과학검역원 조류질병과에서 실험 감염시킨 SPF 닭의 F낭을 유제하여 제조한 가축방역사업용 조직유래항원 (Lot. No. 감보로병 07-01)을 사용하였다. 즉, IBDV P4 strain ($10^{3.0} \sim 10^{4.0}$ EID₅₀/0.1 ml)을 3~4주령 SPF 닭의 점안 및 총배설강 (cloaca) 내로 각각 수당 50 µl씩 접종한 다음, 감염 3일 내지 4일 후 닭의 F낭을 무균적으로 채취하였다. 채취된 F낭은

PBS로 50% (v/v) 유제액이 되도록 유제하였다. 그 후 동결 및 용해를 3회 반복하여 유제한 다음 $3,000 \times g$ 에서 40분간 원심분리한 다음 상층액을 수확하였다. 수확한 상층액은 formalin을 최종 농도 0.1% (v/v)되게 첨가하여 37°C, 24시간 교반하였다. 그 후 formalin을 동일 농도로 첨가하여 동일한 방법으로 처리하는 방법으로 2회 더 반복함으로써 IBDV를 불활화하였다. 불활화한 IBDV 유제상층액은 지질제거 목적으로 동량의 chloroform을 섞어준 다음, 물리적으로 혼든 후 7,500 rpm에서 40분간 원심분리한 다음 상층액을 회수하였다. IBDV 역가 측정을 위해 상층액은 2배 계단 희석하여 AGID하에서 48시간 관찰하였다. 제조한 IBDV 원액검사를 위해 무균시험, 불활화 확인시험, 항원특이성 및 동정시험을 실시하고, 최종적으로 1 vial당 100수분씩 (100 doses/vial) 일정 용기에 분병하여 생산하였다.

3. 표준면역혈청 및 단클론 항체

영국 VLA에서 제공받은 IBDV 닭 면역혈청을 IBD 표준양성혈청으로 사용하였다. IBDV 특이 단클론 항체 R63 및 B29 (9)는 각각 IBDV VP2 및 VP3 단백질에 특이적으로 반응하는 단클론 항체로서, American Tissue Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA)사로부터 구입하였다. 그 이외에, avian poxvirus, avian adenovirus, avian encephalomyelitis virus, infectious bronchitis virus (Mass serotype), Newcastle disease virus에 대한 표준면역혈청은 미국 NVSL로부터, avian rotavirus, chicken anemia virus, avian leucosis virus, reticuloendotheliosis virus, Marek disease virus에 대한 표준면역혈청은 SPAFAS사 (Norwich, CT, USA)로부터 분양받았다.

4. 닭 혈청 시료

IBDV 실험 감염 닭 또는 모체이행항체보유 병아리로부터 주기적으로 채혈하여 국립수의과학검역원 조류질병과에서 보관중인 혈청을 사용하였다. 실험 감염 닭 유래 혈청 41점은 국립수의과학검역원 동물실험계사에서 IBDV 52/70 strain을 3주령 SPF 닭 10수에 인공 감염 (eye drop, $10^{2.1}$ EID₅₀/수)시킨 후 0, 3, 6, 9, 14, 28일에, 일반 육계 (broiler) 병아리 혈청은 국내소재 한 육계 농장으로부터 1, 3, 9, 15, 20, 26, 30, 36일령에 각각 20수씩 채혈하여 분리한 혈청 160점이다 (Table 1). 야외 혈청에 대한 제조합 VP2 단백질을 이용한 AGID의 유효성 평가를 위

하여 3개 농장 1일령 초생추 혈청 155점, 6개 농장 25일령 내지 34일령의 육계 출하계 혈청 119점, 그리고 6개 농장 종계 18주령 내지 75주령의 육용종계 혈청 50점 등 총 324점을 무작위로 선정하여 사용하였다 (Table 2). 육계 농장의 경우 14일령에 intermediate plus형의 IBD 생독백신을 음수로 1회 접종한 농장이며, 육용 종계농장의 경우 채혈 이전에 최소 2회 이상의 생독 백신 (10일 내지 14일령 생독, 3주령 내지 4주령에 생독)을 접종한 농장이었다. 모든 검사 혈청 시료는 56°C에서 30분간 비동화 처리한 후 실험에 사용하였다.

5. IBDV genomic RNA 추출, cDNA 합성 및 VP2 단백질 유전자 증폭

IBDV genomic RNA는 IBDV Kr/D62/06주 함유 CAM 유제액을 TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 추출하였다. IBDV VP2 단백질 유전자의 cDNA 합성 및 증폭은 one-step RT-PCR kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실시하였다. 즉, 서열3 (5'-GAA TTC ATG ACG AAC CTG CAA GAT-3')의 forward primer 및 서열4 (5'-AGA TCT CTA CCT TAG GGC CCG GAT TAT-3')의 reverse primer를 one-step RT-PCR kit용 반응 tube에 첨가한 다음, 50°C에서 30분간 reverse transcription을 실시하였다. 그 후 95°C 15분간 열처리한 후 95°C 20초, 55°C 1분, 72°C에서 2분을 1사이클로 하여 PCR 증폭기 (PE 9600; Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)에서 30 사이클 반복하여 유전자 증폭을 실시하고, 마지막으로 72°C 5분간 DNA 합성을 연장하였다. 상기에서 기술한 forward primer와 reverse primer의 염기서열은 IBDV D78주의 VP2 유전자 염기서열 (Genbank accession no. AF499929)을 기준으로 합성하였다. 또한 유전자 클로닝의 효율성을 위하여 서열1의 5'-말단 시작코돈 (ATG) upstream에 *EcoR* I 제한효소 반응부위를, 서열2의 5'-말단 종료코돈 (TGA) upstream에 *Bgl* II 제한효소 반응부위를 각각 추가하였다. 상기의 RT-PCR법으로 증폭된 cDNA 증폭산물은 agarose electrophoresis를 실시하여 증폭산물의 크기를 확인하고, VP2 단백질 유전자 DNA 증폭산물은 gel extraction kit (Qiagen)를 이용하여 agarose gel로부터 추출하였다. 추출한 VP2 유전자 cDNA를 pGEM-Teasy vector (Promega, Madison, WI, USA)의 multicloning site에 삽입하여 "pGEMT/IBDV2"를 제작하였다. 클로닝 벡터내 IBDV VP2 유전자의 삽입여

부는 자동염기서열분석기 (ABI 377, Foster City, CA, USA)를 사용하여 삽입된 유전자의 염기서열을 비교 분석함으로써 VP2 유전자 cDNA의 올바른 삽입여부를 확인하였다.

6. 재조합 baculovirus expression vector 제작

상기의 pGEMT/IBDV2 construct를 *EcoR* I 및 *Bgl* II로 처리하여 해당 DNA 단편을 추출하였다. 한편, 베쿨로마이러스 발현 벡터 pAcHLT ATM (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 역시, 동일한 제한효소로 절단한 다음 상기의 VP2 DNA 단편을 polyhedrin promoter (P_{PH})가 있는 유전자 부위의 downstream에 위치한 multicloning site내 삽입하여, IBDV VP2 유전자가 삽입된 재조합 베쿨로 바이러스 발현 벡터인 pAcHLT/IBDV2를 제작하였다.

7. 재조합 baculovirus 제작

IBDV VP2 유전자가 삽입된 재조합 baculovirus (Bac/IBDV2)는 BaculogoldTM baculovirus expression system (BD Biosciences)을 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 작성하였다. 즉, 단충 배양된 *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cell에 상기의 pAcHLT/IBDV2 construct와 BaculogoldTM baculovirus linear DNA (BD Biosciences)를 co-transfection시킨 후 27°C에서 5일간 배양하면서 cytopathic effects (CPE) 출현여부를 관찰하였다. 그 후 transfection시킨 cell supernatant를 수확하고 plaque assay를 실시하여 순수하게 recombinant baculovirus를 분리하였다. 그 후, 몇 개의 plaque를 채취하여 Sf9 cell에 접종하여 27°C에서 4일간 배양하여 CPE 출현여부를 관찰하고, 감염 Sf9 cell을 단클론 항체 R63 (ATCC)과 IBDV 고도면역 닭 혈청으로 VP2 단백질 발현여부를 확인하여 recombinant baculovirus Bac/IBDV2를 제작하였다. 또한 감염세포로부터 추출한 재조합 IBDV VP2 단백질은 12% SDS-PAGE 후 Western blot법으로 단클론 항체 R63과의 반응여부를 조사하여 확인하였다.

8. IBDV VP2 융합단백질 생산

세포배양용 150-cm² flask에 배양된 Sf9 cell monolayer에 100 M.O.I (multiplicity of infection)의 recombinant baculovirus Bac/IBDV2를 감염시킨 후 27°C에서 6일간 배양하였다. 그 후, flask내 감염 세포들을 수확하여 4°C에서 3,000 rpm, 10분간 원심분리하여 상층액을 버리고 세포

침전물은 1/10 volume의 0.1 M PBS에 부유시켰다. 재조합 IBDV VP2 융합단백질을 함유한 세포 침전물을 flask 5개당 10 ml 되게 0.01 M PBS, pH 7.4에 현탁한 후 얼음에서 30분간 반응시키면서 sonication (10초 처리, 10초 휴식, 총 10분간)을 실시하여 세포를 파쇄하였다. 그런 다음, 파쇄된 세포부유액을 4°C 13,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 수확하였다. 수확한 재조합 IBDV VP2 융합단백질은 사용 전까지 -20°C에 보관하였다.

9. 재조합 VP2 융합단백질의 정제

재조합 IBDV VP2 단백질을 정제하기 위하여 우선 NTA column (BD sciences)에 5 ml NTA-agarose를 충전하고 0.1 M PBS로 3회 세척하였다. 그 후 1 × binding buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.4) 50 ml를 column에 loading하여 equilibration하도록 하였다. 그 후 상기에서 준비한 재조합 IBDV VP2 단백질 10 ml를 column에 분당 2 ml씩 loading하였다. 그 후 wash buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4)으로 3회 column을 세척하였다. 그 후 1 × elution buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.4)를 column에 loading하고 elution하여 각 fraction을 conical tube에 수확하였다. 각 fraction별 BCATM protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL, USA)로 단백질량을 정량하여 단백질량 200 µg/ml 이상인 fraction을 회수하여 12% SDS-PAGE로 VP2 단백질을 확인하였다. VP2 단백질이 포함된 각 fraction을 pooling한 다음 0.1 M PBS에서 dialysis를 실시하였다. 그 후 단백질을 BCA로 정량하여 재조합 IBDV VP2 융합단백질의 항원성 확인 실험에 사용하였다.

10. IBDV 및 recombinant VP2 단백질의 정량

IBDV와 recombinant VP2 단백질의 정량은 sandwich ELISA법으로 실시하였다. 우선, carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6으로 희석한 단클론 항체 R63 (최종희석농도 4 µg/ml)을 Nunc Maxisorp ELISA plate에 well당 50 µl씩 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 부착시켰다. 그 후 세척용 완충용액 (0.01 M PBS + 0.02% Tween 20)으로 3회 반복 세척한 후 항원검사용 시료를 well당 50 µl씩 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척용 완충용액으로 3회 반복 세척한 후 항-IBDV 표준혈청 (1:1,000 희석)을 well당 50 µl씩 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척용

완충용액으로 3회 반복 세척한 후 horseradish peroxidase (HRP)가 부착된 anti-chicken immunoglobulins antibody (100 ng/ml, Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA)를 well당 50 μ l씩 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척용 완충용액으로 3회 반복 세척한 후 TMB용액 (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 well당 50 μ l씩 첨가하여 10분간 실온에서 발색시킨 다음 반응중지 용액 (0.05 M sulfuric acid)을 well당 50 μ l씩 첨가하여 발색을 중지시켰다. Optical density (OD)는 ELISA reader (Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 A450에서 측정하였다. 대조 양성항원 (positive antigen) 흡광도는 IBDV D78 strain (0.25×10^3 EID₅₀/ml)의 흡광도로 하였다. 각 검사시료의 ELISA unit는 S/P ratio (sample/positive, 검사시료의 OD값/대조 양성항원 OD값)에 혈청희석배수를 곱한 값으로 계산하였다.

11. Agar Gel Immunodiffusion (AGID)에 의한 IBDV 항체검출

AGID는 국제수역사무국에서 권장하는 방법에 따라 실시하였다. 본 연구에서 생산한 재조합 VP2 단백질 항원과 비교 실험을 위하여 AGID용 IBDV 조직유래항원 (Lot. No. 07-01)을 표준 항원으로 포함하였다. 열탕으로 완전히 용해시킨 한천 겔 용액 (1% Noble agar, 8% NaCl, 2% PEG8000, 100 ml distilled water, pH 7.2)을 petri dish (87 \times 15 mm)에 20 ml 첨가하여 실온에서 고형화시켜 AGID plate를 제조하였다. 검사 결과의 판정은 항원 항체반응에 의하여 well 사이에 침강대가 형성된 경우 양성으로 판정하였다.

12. ELISA kit에 의한 IBDV 항체검출

AGID법과 IBDV 항체검출법의 비교 분석을 위하여 IBDV 항체검출용 ELISA를 실시하였다. ELISA는 Flock-Check IBD-XR kit (IDEXX, Portland, ME, USA)를 이용하여 제조사에서 제시한 방법에 따라 실시하였다. 즉, IBD 항원이 coating되어 있는 ELISA plate에 dilution buffer로 1:500배 희석한 혈청을 well당 100 μ l씩 첨가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 그 다음 ELISA plate를 증류수로 3회 세척한 다음 goat anti-chicken immunoglobulin-horseradish peroxidase conjugate 용액 (Kirkegaard & Perry Laboratories)을 well당 100 μ l씩 첨가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 그 후 ELISA plate를 증류수로 3회 세척

하고 TMB 용액을 well당 100 μ l씩 첨가하여 15분간 발색시켰다. 그 후 stop solution을 well당 100 μ l씩 첨가하여 발색반응을 중지시키고 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검사 시료의 흡광도는 S/P ratio로 환산하였으며, ELISA 역가는 kit에서 제공하는 술식 [\log_{10} Titer = $1.09 (\log_{10} S/P) + 3.36$]에 의하여 계산하였으며, ELISA 역가가 396 이상 일 때 항체 양성으로 판정하였다.

13. 바이러스중화시험법 (VNT)에 의한 IBDV 항체검출

바이러스중화시험은 96-well microtitre plates에서 실시하였다. 실험 전 56°C에서 30분간 비동화 처리한 혈청을 사용하였다. Microtitre plate에서 alpha-MEM (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) 배양액으로 2배 계단 희석한 비동화 혈청 50 μ l와 동량의 IBDV (Edgar strain, 100 TCID₅₀/50 μ l) 용액을 혼합하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 그 후 chicken embryofibroblast (CEF) cells (1×10^6 cells/ml)을 well당 200 μ l씩 첨가하여 37°C CO₂ incubator에서 5일간 배양하였다. 중화항체 역가는 CPE 형성이 억제된 최대 혈청희석배수의 역수로 하였다.

결 과

1. Recombinant baculovirus에 의한 IBDV VP2 단백질 발현

국내유행 강병원성 IBDV Kr/D62/06주의 VP2 유전자를 발현하는 recombinant baculovirus "Bac/IBDV2"는 IBDV VP2 유전자를 함유하는 recombinant expression vector "pAChLT/IBDV2"와 Baculogold™ baculovirus linear DNA를 Sf9 cell에서 co-transfection 시킴으로서 성공적으로 제작되었다. Bac/IBDV2 감염 Sf9 세포는 IBDV 특이 단클론 항체 R63과 항IBDV 고도면역 닭 혈청으로 형광염색한 결과 강한 형광반응을 보였으나, 정상 Sf9 세포는 동일 항체로 검사한 결과 형광염색반응을 나타내지 않았다 (Fig. 1). 또한, Bac/IBDV2 감염 Sf9 세포에서 추출한 단백질을 SDS-PAGE법으로 분석 결과 약 50 kDa의 분자량을 가지고 있었으며, 이 단백질은 Western blot법에서 IBDV VP2 특이 단클론 항체 R63에 대하여 강한 양성 반응을 나타내었으나, IBDV VP3 특이 단클론 항체 B29에 대하여는 반응성이 관찰되지 않았다 (Fig. 2). 따라서, 상기의 결과들을 종합해 볼 때 Sf9 세포에서 재조합 baculovirus (Bac/IBDV2)에 의하여 발현된 단백질은

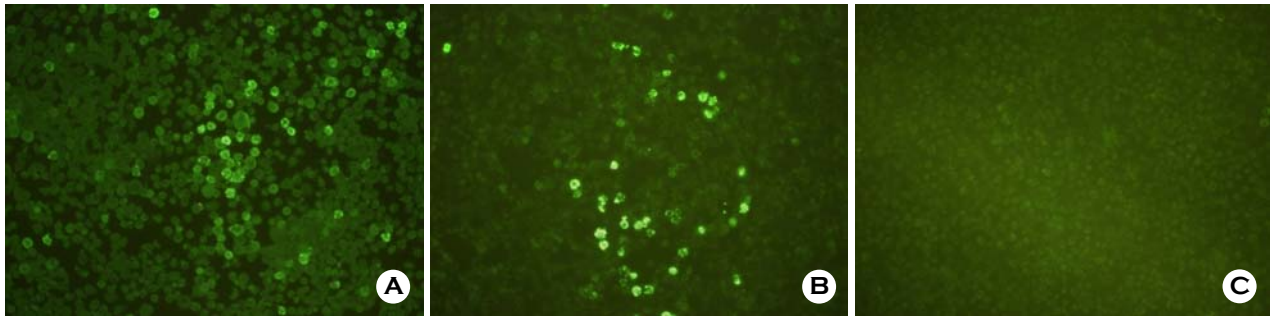


Figure 1. Immunofluorescence staining of IBDV VP2 protein expression. The Sf9 cells infected with recombinant baculovirus (Bac/IBDV2) were stained using chicken anti-IBDV antiserum (A), IBDV-specific monoclonal antibody R63 (B) and IBDV antibody negative chicken serum (C).

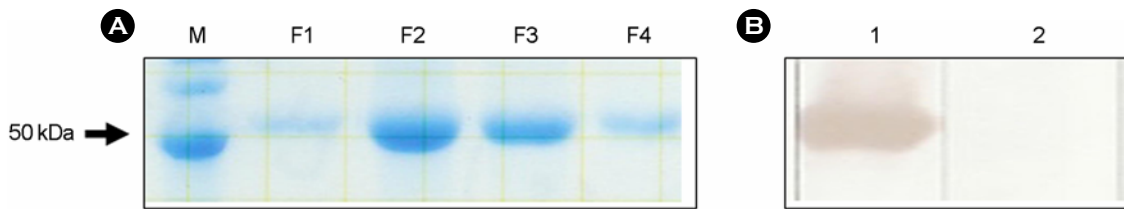


Figure 2. Analysis of purified IBDV VP2 protein expressed from Sf9 cells by recombinant baculovirus (Bac/IBDV2). **A:** SDS-PAGE analysis of purified IBDV VP2 protein fractions F1 (103 µg/ml), F2 (665 µg/ml), F3 (275 µg/ml) and F4 (98 µg/ml); **B:** Western blot analysis of purified IBDV VP2 protein fraction F2 using IBDV VP2-specific monoclonal antibody R63 (lane 1) and VP3-specific monoclonal antibody B29 (lane 2).

IBDV VP2 단백질인 것으로 판단된다.

또한, 재조합 VP2 단백질은 Bac/IBDV2를 감염시킨 Sf9 세포를 감염 4일 후에 수확하여, 150 cm² flask당 2 ml 씩 총 10 ml되게 추출한 다음, NTA column으로 정제하여 총 4 fractions를 수확하여 단백질을 정량하였다. 그 결과 각 fraction별 단백질량은 fraction 1은 103 µg/ml, fraction 2는 665 µg/ml, fraction 3은 275 µg/ml, fraction 4는 98 µg/ml이었다. 이들 중 200 µg/ml 이상의 단백질량을 가진 fraction 2와 fraction 3을 pooling하였다. Pooling한 단백질을 정량한 결과 제조 항원은 470 µg/ml이었다.

2. 재조합 VP2 단백질의 AGID 적정 항원량 결정

재조합 VP2 단백질의 적정 항원량의 표준화를 위하여 sandwich ELISA 방법으로 ELISA 흡광도와 VP2 단백질량을 비교 측정하였다. 대조 항원 IBDV D78 strain의 경우 감염 역가 (EID₅₀/ml)와 ELISA OD값간의 상관성은 최소한 0.1×10³ EID₅₀/ml의 감염량(X) 범위내에서 ELISA 흡광도 (Y)간에는 높은 상관성 (r²=0.946)을 나타내었으며, 회귀곡선 (regression curve) 식은 Y = 0.0001 X + 0.232 이었다 (Fig. 3A). IBDV VP2 단백질량을 표준화하기 위하

여 흡광도와 IBDV VP2 단백질량을 S/P ratio와 ELISA unit (EID₅₀/ml 대비 IBDV VP2 단백질량)로 환원시킨 결과, 1.0에서 5.4의 S/P ratio (Y) 범위에서 ELISA unit (X)와 높은 상관성 (r²=0.946)이었으며, 이때의 회귀곡선 공식은 Y = 0.001 X + 0.858이었다. 본 연구에서 생산 정제한 IBDV VP2 발현 단백질의 경우 단백질 농도가 12 ng/ml에서 1.5 µg/ml의 범위에서 ELISA 흡광도와 상관성을 나타내었으며 (Fig. 3B), 이 회귀곡선 공식을 활용하여 IBDV VP2 단백질 항원량을 ELISA unit로 측정한 결과, 4.8±0.5×10⁶ ELISA unit였다. AGID 조직유래항원 (Lot No .07-01)의 경우 4.6±1.0×10⁵ ELISA unit의 항원 농도를 보였다.

진단항원으로서의 재조합 VP2 단백질의 적정 항원량을 설정하기 위하여 IBDV 표준양성혈청을 이용한 end-point titration AGID를 실시하였다. 그 결과, 재조합 VP2 단백질 (4.8±0.5×10⁶ ELISA unit)은 최소 16배 희석배수에서도 표준양성혈청과 침강대를 형성하였다. 이를 기초로 재조합 VP2 단백질의 AGID 진단항원으로서의 적정 단백질량을 6×10⁵ ELISA unit로 설정하였다. 상기 적정 단백질량 조건에서 재조합 VP2 단백질이 IBD 이외의

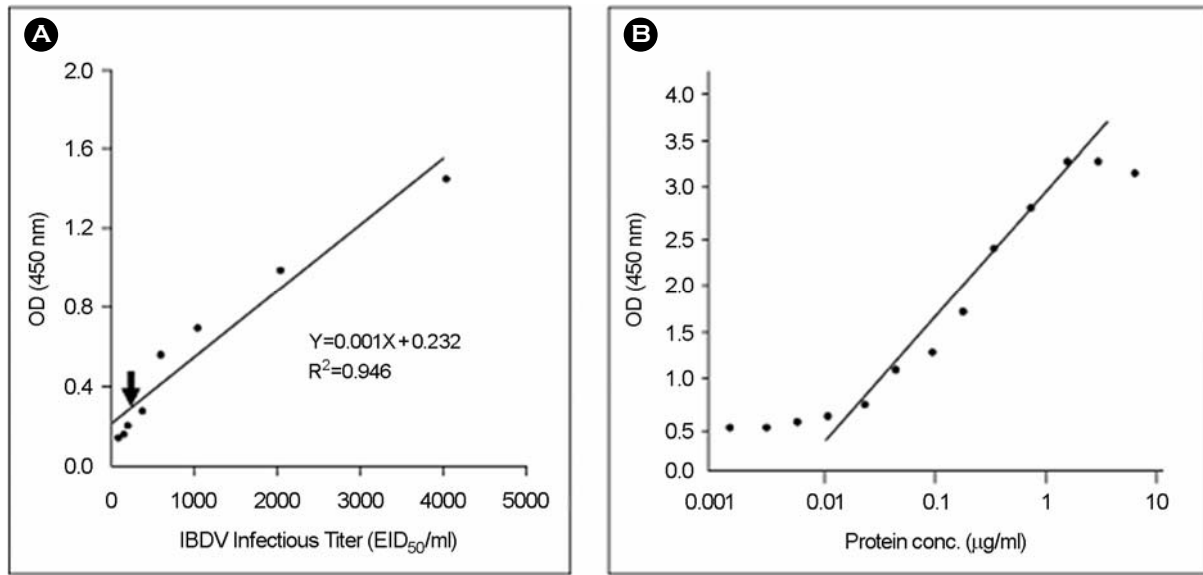


Figure 3. Titration of IBDV (A) or recombinant IBDV VP2 protein (B) by sandwich ELISA using monoclonal antibody R63 and anti-IBDV chicken serum.

Table 1. Detection of anti-IBDV antibodies in SPF chickens following experimental infection by AGID assays

DPI	ELISA ^a	VNT ^b	AGID	
			IBDV	rVP2
0	0/10 ^c	0/10	0/10	0/10
3	0/4	0/4	0/4	0/4
6	6/6	5/6	5/6	5/6
9	6/6	6/6	6/6	6/6
14	7/7	7/7	7/7	7/7
28	7/7	7/7	7/7	7/7

^a Serum with ELISA titers of ≥ 396 was considered positive.

^b Serum with VN titers of ≥ 8 was considered positive.

^c No. Positive/No. tested

조류전염병 병원체에 대하여 특이성을 가지고 있는 지를 AGID법으로 조사하였다. 그 결과, 재조합 VP2 단백질은 avian pox virus, avian adenovirus, avian rota virus, infectious laryntracheitis virus, infectious bronchitis virus (Mass serotype), Marek's disease virus, avian encephalomyelitis virus, Newcastle disease virus에 대한 표준면역혈청과 agar gel 상에서 어떠한 침강대 (항원-항체반응)를 형성하지 않았다.

3. 실험 감염 닭에서의 IBDV 항체검출 여부 조사

SPF 닭에 IBDV를 실험 감염시킨 후 주기적으로 채혈하여 재조합 VP2 단백질을 이용한 항원을 이용한 AGID법으로 혈

청검사를 실시하고, 그 결과를 다른 IBDV 혈청검사법과 비교하였다 (Table 1). 그 결과, IBDV (52/70 strain)를 공격 접종한 SPF 닭에서 감염 후 6일째부터 IBDV 항체를 재조합 VP2 단백질을 이용하여 검출할 수 있었으며, 실험 최종일인 28일까지 지속적으로 IBDV 항체를 검출할 수 있었다. 이러한 결과는 IBDV 항원을 이용한 AGID법의 결과와도 일치하였다. VNT 및 IDEXX-ELISA kit 검사 결과와 비교 분석하였을 때 VNT의 경우 중화항체가 8배 이상 또는 ELISA 양성 혈청 (혈청 1점 제외)에서 모두 AGID 검사 결과와 일치하였다.

4. 야외 농장유래 닭 혈청에서의 IBDV 항체검출

1일령 초생주 혈청 155점, 육계 출하계 혈청 119점, 그리고 육용종계 혈청 50점 등 총 324점을 대상으로 재조합 VP2 단백질을 이용한 항원을 이용한 AGID법으로 혈청검사를 실시하고, 그 결과를 기존 IBDV 항원을 이용한 AGID의 혈청검사 결과와 비교하였다 (Table 2). 그 결과 재조합 VP2 단백질을 이용한 항원을 이용한 AGID법은 324점 중 323점에서 IBDV 항체를 검출할 수 있었다. 또한, 기존 IBDV 항원을 이용한 AGID의 검사 결과와 완전히 일치하였다.

5. 병아리에서의 IBDV 모체이행항체의 경시적 검출

국내 한 종계장에서 갓 부화된 boiler 20수로부터 주기

Table 2. Detection of anti-IBDV antibodies in SPF chickens following experimental infection by AGID assays

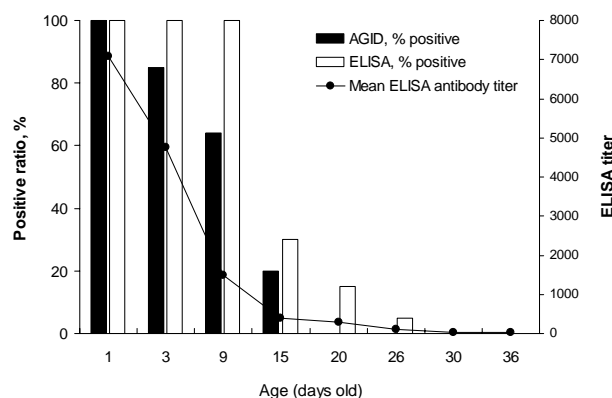
Group	Age	Serum no. tested	AGID	
			IBDV	rVP2
Broiler	1 day old	155 (3) ^a	155/155 ^b	155/155
Boiler	25 to 34 days old	119 (6)	119/119	119/119
Broiler breeder	18 to 75 months old	50 (5)	49/50 ^c	49/50 ^c

^a Number in parenthesis represents number of farm tested.^b No. Positive/No. tested.^c One serum with negative result in AGID using rVP2 antigen was also negative for AGID using IBDV antigen.

적으로 채혈하여 일령별 모체이행항체 검출여부를 재조합 VP2 단백질을 이용하여 AGID법으로 조사하고, 그 결과를 연령별 ELISA titer와 비교 분석하였다. ELISA 검사 결과를 항체 역가의 측면에서 분석해 보면 1일령에 7000이었던 계군 평균 ELISA 역가는 약 3.5일의 반감기를 가지고 15일 때까지 지속적으로 떨어지는 패턴을 보였으며, 15일령 이후에는 계군 평균 항체가 ELISA 항체양성 판정기준치인 ELISA titer 396 이하를 나타내었다 (Fig. 4). AGID 검사 결과 1일령 이후 항체검출율이 15일까지 지속적으로 하락하여 15일령이 지난 이후에는 AGID에 의한 항체가 검출되지 않았다. 반면 ELISA의 양성율은 9일령까지 100% 양성율을 유지하다가 26일령까지 지속적으로 항체 양성율이 떨어지다가 그 이후 연령에서는 모체이행항체가 검출되지 않았다. ELISA 음성혈청 94점은 모두 AGID에서 음성반응을 나타내었다. 그러나, ELISA 양성 (ELISA titer 396 이상) 혈청 66점 중 11점은 AGID에서 항체음성반응을 보였으며, 이들 혈청 11점 중 10점은 400배 이상 1500배 이하 수준의 ELISA titer를 보였다.

고 찰

본 연구에서 재조합 baculovirus에 의해 재조합 VP2 단백질을 Sf9 세포에서 생산하였으며, 생산된 재조합 VP2 단백질은 감염 닭을 이용하여 생산 제조한 기존의 조직유래항원 대체 가능성을 조사하였다. 현재까지 재조합 VP2 단백질 생산에 관한 연구 결과들이 여러 연구자들에 의해 보고되었으나, 이들 보고 대부분이 IBDV 피해예방을 위한 subunit 백신 개발의 목적이었다 (8,10,21~

**Figure 4.** Detection of anti-IBDV maternal antibodies in broiler measured by AGID test using recombinant IBDV VP2 protein.

23,25). 그 동안 재조합 VP2 단백질을 IBDV 항체검출용 진단항원으로서 활용한 보고가 매우 드물다는 점에서 본 연구에서 진단항원으로서의 재조합 VP2 단백질의 효능 확인 및 적용은 그 의의가 크다 하겠다.

VP2 단백질은 IBDV의 캡시드를 구성하는 주요 바이러스 구조단백질로서, 숙주에서 humoral immune response를 유발하는 주된 바이러스 단백질 부위이기 때문에 본 연구에서 재조합 VP2 단백질을 진단항원의 target으로 설정하였다. 본 연구에서는 대장균이 닭에서 흔하게 감염되는 세균이라는 점을 감안해 볼 때 기존 연구에서 많이 적용한 대장균 발현체계는 비특이 반응 (non-specific reaction)을 유발할 수 있다는 점을 감안하여 대장균 발현체계 대신에 baculovirus 발현체계를 이용하여 VP2 단백질을 생산하였다. 본 연구에서 5개의 150-cm² flask를 이용하여 450 ml의 진단액 항원을 제조하였는데, 이때 생산된 진단액 양은 약 90,000수분의 AGID 진단항원량에 해당되었다. 그러므로, Sf9 세포 배양법에 의한 재조합 VP2 단백질 항원생산은 그 발현 단백질량의 측면에서 볼 때 AGID 진단항원으로서 생산하는 것 또한 가능하다는 것을 보여준다.

본 연구의 재조합 VP2 단백질 진단항원의 제조 방법은 여러 가지 측면에서 조직유래항원의 제조 방법에 비해 여러 가지 장점이 있다. 첫째, 재조합 VP2 단백질 항원은 전염성이 없기 때문에 병원체 취급 제한 등의 문제없이도 일반 실험실에서도 안전하게 생산할 수 있다. 둘째, 기존 조직유래 IBDV 항원의 제조공정이 약 5주 정도 소요 (안전기간 1주 + 감염시험 1주 + 조직항원 추출 1주 + 자가검정 2주)되는 데 반해, 재조합 VP2 단백

질 진단항원의 제조기간은 1주 정도 소요되므로 항원제조 소요기간이 약 4주 정도 단축하게 된다. 셋째, 재조합 VP2 단백질 진단항원은 제조공정이 기존 조직항원에 비해 제조공정이 간단하기 때문에 세포배양이 가능한 일반 실험실에서 제조가 가능하다. 넷째, 진단항원을 제조하는 데 있어서 현행 IBDV 진단항원 제조공정과 달리 제조 과정에서 SPF 닭을 사용하지 않으므로 특수 동물 실험 시설의 사용 문제나 동물실험 윤리 등과 같은 논란을 피할 수 있다.

재조합 단백질 항원을 AGID 진단액의 목적으로 생산하기 위해서 제조 단계에서의 표준화된 항원 품질관리가 요구된다는 점을 고려하여 본 연구에서 제조 항원내 재조합 단백질의 표준화된 정량을 위하여 sandwich ELISA를 확립하였다. 여기에 사용된 sandwich ELISA는 단백질 항원에 결합한 VP2특이 단클론 항체의 반응량을 측정하는 방법을 사용함으로써 각 제조 항원내 함유된 VP2 단백질 농도를 측정하고자 하였다. 본 연구의 재조합 VP2 단백질 적정 단백질량은 6×10^5 ELISA unit로 설정하였는데, 이 농도의 재조합 VP2 단백질은 Table 1에서 보는 바와 같이 AGID에서 조직유래 IBDV 항원과 동일한 항체검출 민감도를 가지고 있는 것으로 조사되었으며, ELISA unit 농도 또한 유사 ($4.6 \pm 1.0 \times 10^5$ ELISA unit)하였다. 이것은 재조합 VP2 단백질 항원과 조직유래항원내 함유된 VP2 단백질의 농도가 유사한 수준임을 말해주는 것으로 판단된다.

AGID 항체검출 민감도와 관련하여, Table 1에서 보는 바와 같이 8배 이상의 IBDV 중화항체 (VN) 역가를 가진 혈청은 모두 AGID 양성반응을 나타내어 VNT와 유사한 민감도를 보였다. 다만, 본 연구에서는 현재 북미대륙 등에서 유행하고 있는 항원성 변이주에 대한 평가는 국내 발생사례가 없어 바이러스 시료 확보의 어려움 때문에 이루어지지 않았다. 이러한 항원성 변이주와 닭에서 발생하는 기존 IBDV간에는 동일한 혈청형이지만, 항원적인 차이가 일부 존재하는 것으로 알려져 있다는 점을 감안한다면, 항원성 변이주 항체시료에 있어서는 기존 IBDV 또는 기존 IBDV 유래 재조합 VP2 단백질 항원을 이용하는 AGID가 항원성 변이주를 이용한 VNT에 비해 다소 민감도는 낮아질 것으로 판단된다. 향후 항원성 변이주 항체에 대한 재조합 VP2 단백질 항원을 이용한 AGID의 평가가 필요하다.

본 연구의 AGID를 IBDV 항체검출 ELISA kit와 비교

하여 보았을 때 Fig. 4에서 보는 바와 같이 재조합 VP2 단백질 항원을 이용한 AGID는 ELISA kit에 비해 다소 항체검출 민감도가 낮은 것으로 판단된다. Table 1 및 Table 2에서 보는 바와 같이 AGID에서 재조합 VP2 단백질 항원이 IBDV 항원과 동일한 IBDV 항체검출 민감도를 가지고 있다는 점을 감안해 볼 때, AGID의 낮은 민감도는 재조합 VP2 단백질 항원의 특성에 기인한 것이라기보다는 진단하는 방법상의 차이에서 초래되었을 가능성이 높다고 본다. 그러므로, 재조합 VP2 단백질 항원을 이용한 ELISA법을 개발할 경우 동일 항원을 이용한 AGID보다 IBDV 항체검출 민감도는 향상될 것으로 판단된다. 향후 재조합 VP2 단백질 항원을 이용한 IBDV 항체검출용 ELISA 개발을 진행하여 IBDV 항체검출용 검사법으로서의 유효성을 평가해 볼 예정이다.

참 고 문 헌

- 1) 이영옥, 김순재, 최정옥, 전무상, 박근식: 국내종계의 infectious bursal disease virus의 감염상황 및 분리주의 생물학적 특성. 농사시험보고서 (축산, 가축위생편). **23**: 136-142, 1981.
- 2) Böttcher B, Kiselev NA, Stel'Mashchuk VY, Perevozchikova NA, Borisov AV, Crowther RA: Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J Virol* **71**: 325-330, 1997.
- 3) Brandt M, Yao K, Liu M, Heckert RA, Vakharia VN: Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J Virol* **75**: 11974-11982, 2001.
- 4) Cullen GA, Wyeth PJ: Quantitation of antibodies to infectious bursal disease. *Vet Rec* **97**: 315, 1975.
- 5) Delmas B, Kibenge FSB, Leong JC, Mundt E, Vakharia VN, Wu JL: Birnaviridae. pp 561-569. In Virus Taxonomy. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Ed), Academic Press, London, 2004.
- 6) Fahey KJ, Erny K, Crooks J: A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. *J Gen Virol* **70**: 1473-1481, 1989.
- 7) Fahey KJ, McWaters P, Brown MA, Erny K, Murphy VJ, Hewish DR: Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of

- chickens. *Avian Dis* **35**: 365-373, 1991.
- 8) **Francois A, Chevalier C, Delmas B, Eterradossi N, Toquin D, Rivallan G, Langlois P**: Avian adenovirus CELO recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens. *Vaccine* **22**: 2351-2360, 2004.
 - 9) **Gagic M, Lazic S, Asanin R, Kapetanov M**: Production of the antigen of infectious bursal disease virus (IBDV) for the agar-gel precipitin test and its sensitivity compared to the virus neutralization test and ELISA. *Acta Veterinaria* **46**: 95-102, 1996.
 - 10) **Heine HG, Boyle DB**: Infectious bursal disease virus structural protein VP2 expressed by a fowlpox virus recombinant confers protection against disease in chickens. *Arch Virol* **131**: 277-292, 1993.
 - 11) **Ismail NM, Saif YM, Moorhead PD**: Lack of pathogenicity of five serotype 2 infectious bursal disease viruses in chickens. *Avian Dis* **32**: 757-759, 1988.
 - 12) **Jackwood DJ, Henderson KS, Jackwood RJ**: Enzyme-linked immunosorbent assay-based detection of antibodies to antigenic subtypes of infectious bursal disease viruses of chickens. *Clin Diagn Lab Immunol* **3**: 456-463, 1996.
 - 13) **Jackwood DJ, Saif YM, Moorhead PD**: Immunogenicity and antigenicity of infectious disease virus serotypes I and II in chickens. *Avian Dis* **29**: 1184-1194, 1985.
 - 14) **Kim TK, Yeo SG**: Cloning and nucleotide analysis of segment A gene of infectious bursal disease virus detected in Korea. *Virus Genes* **26**: 97-106, 2003.
 - 15) **Kwon HM, Kim DK, Hahn TW, Han JH, Jackwood DJ**: Sequence of precursor polyprotein gene (segment A) of infectious bursal disease viruses isolated in Korea. *Avian Dis* **44**: 691-696, 2000.
 - 16) **Kwon HM, Kim DK, Seong HW**: Sequence analysis of the variable VP2 gene of infectious bursal disease viruses isolated in Korea. *Korean J Vet Res* **39**: 545-553, 1999.
 - 17) **Kwon YK, Mo IP, Seong HW, Kang MI, Koh HB, Lee JG, Yang CK**: Studies on the pathogenicity of infectious bursal disease virus (SH/92) isolated in Korea. *RDA J Agri Sci* **37**: 637-647, 1995.
 - 18) **Lukert PD, Saif YM**: Infectious bursal disease. pp 721-738. In *Disease of poultry*, 10th ed, Calnek BD, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM (Ed), Mosby-Wolfe, Ames, Iowa, 1997.
 - 19) **Marquardt WW, Johnson RB, Odenwald WF, Schlotthober BA**: An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis* **24**: 375-385, 1980.
 - 20) **McFerran JB, McNulty MS, McKillop ER, Conner TJ, McCracken RM, Collins DS, Allan GM**: Isolation and serological studies with infectious bursal diseases from fowl, turkey and duck: demonstration of a second serotype. *Avian Pathol* **9**: 395-404, 1980.
 - 21) **Omar AR, Kim CL, Bejo MH, Ideris A**: Efficacy of VP2 protein expressed in *E. coli* for protection against highly virulent infectious bursal disease virus. *J Vet Sci* **7**: 241-247, 2006.
 - 22) **Pitcovski J, Di-Castro D, Shaaltiel Y, Azriel A, Gutter B, Yarkoni E, Michael A, Krispel S, Levi BZ**: Insect cell-derived VP2 of infectious bursal disease virus confers protection against the disease in chickens. *Avian Dis* **40**: 753-761, 1996.
 - 23) **Pitcovski J, Gutter B, Gallili G, Goldway M, Perelman B, Gross G, Krispel S, Barbakov M, Michael A**: Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine* **21**: 4736-4743, 2003.
 - 24) **Rodriguez-Chavez IR, Rosenberger JK, Cloud SS, Pope CR**: Characterization of the antigenic, immunogenic, and pathogenic variation of infectious bursal disease virus due to propagation in different host systems (bursa, embryo, and cell culture), III: pathogenicity. *Avian Pathol* **31**: 485-492, 2002.
 - 25) **Rong J, Cheng T, Liu X, Jiang T, Gu H, Zou G**: Development of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine* **23**: 4844-4851, 2005.
 - 26) **Sharma JM, Dohms JE, Metz AL**: Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of IBDV and their effect on humoral and cellular immune competence of specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis* **33**: 112-124, 1989.
 - 27) **van den Berg TP**: Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol* **29**: 175-194, 2000.
 - 28) **van den Berg TP, Morales D, Eterradossi N, Rivallan G, Toquin D, Raue R, Zierenberg K, Zhang MF, Zhu YP, Wang CQ, Zheng HJ, Wang X, Chen GC, Lim BL, Muller H**: Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. *Avian Pathol* **33**: 470-476, 2004.

- 29) **Wu CC, Rubinelli P, Lin TL:** Molecular detection and differentiation of infectious bursal disease virus. *Avian Dis* **51:** 515-526, 2007.
-