

## RT/PCR과 RFLP 분석에 의한 Infectious bursal disease virus (국내분리주)의 특성 규명

권혁무 · 김대규 · 성환우\*

강원대학교 수의학과  
국립수의과학검역원\*  
(1998년 10월 7일 접수)

### Characterization of infectious bursal disease viruses isolated in Korea using RT/PCR and RFLP analysis

Hyuk-moo Kwon, Dae-kyu Kim, Hwan-woo Seong\*

*Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University  
National Veterinary Research and Quarantine Service\**

(Received Oct 7, 1998)

**Abstract** : Field infectious bursal disease viruses (IBDVs) were isolated from IBDV-suspected commercial chickens. The variable region in VP2 gene of six Korean IBDV isolates (K-IBDVs) and IBD vaccines was examined using the reverse transcriptase / polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (RT/PCR-RFLP) assay. With all K-IBDVs and vaccine IBDVs, a 474-bp fragment of the VP2 gene was amplified and tested with various restriction enzymes. Restriction enzymes *Bst*NI and *Sty*I differentiated K-IBDV isolates and IBD vaccines into four groups. Restriction enzyme profiles of K-IBDV isolates were different from them of IBD vaccines. K-IBDV isolates except for 310 isolate had specific *Ssp*I and *Taq*I recognition sites, which were recognized in highly virulent IBDVs, but IBD vaccines had no those sites. This study showed that RT/PCR-RFLP assay was thought to be valuable tool for differentiation of IBDVs and identification of highly virulent IBDV.

**Key words** : infectious bursal disease virus, VP2 gene, RT/PCR-RFLP.

---

본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구비(971-0605-038-2) 지원으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.  
Address reprint requests to Dr. Hyuk-moo Kwon, Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea.

## 서 론

전염성 F낭병 바이러스(Infectious bursal disease virus, IBDV)가 원인체인 전염성 F낭병(Infectious bursal disease, IBD) 또는 감보로병(Gumboro disease)은 조류에서 경제적으로 피해가 크고 전염성이 높은 질병이다<sup>1</sup>. 감염후 IBDV는 조류의 특이 면역기관인 F낭의 발육중인 B림프구에서 급속히 증식하여 면역억제를 일으키고 다른 질병에 대한 감수성을 증가시킨다.

IBDV는 double stranded RNA로 구성된 두 개의 segment(A와 B)로 구성되어 Birnaviridae의 Avibirnavirus에 속한다<sup>2</sup>. Segment A(약 3.3kbp)는 VP2, VP3 그리고 VP4로 되는 109-Kda의 precursor polyprotein과 VP5를 발현한다. 그 중에서 VP2(약 494 amino acid)는 구조의존형으로 중화항체와 혈청형의 특이성과 관계 있는 antigenic region을 포함하고 있다. Segment B(약 2.9kbp)는 dsRNA polymerase인 VP1을 발현한다<sup>3-6</sup>. IBDV는 중화시험에 의하여 두 가지 혈청형(serotype I과 II)으로 구분되어 왔는데 serotype I에 속하는 IBDV는 최소 6가지의 antigenic subtype으로 구별될 수 있다<sup>7,8</sup>. Serotype II에 속하는 바이러스는 닭에 병원성을 나타내지 않는 반면 serotype I에 속하는 바이러스는 다양한 병원성과 항원성의 변이가 일어난다<sup>9-11</sup>. IBD를 예방하기 위한 가장 효과적인 방법은 종계를 면역시켜 생성된 모체이항항체에 의하여 병아리가 IBDV에 대한 방어능력을 획득하도록 하는 것이다<sup>12</sup>. 백신프로그램의 진보에도 불구하고 IBD는 계속 발생하고 있어 양계산업에 큰 피해를 주고 있다. 중요한 원인중에 하나는 항원성이 다른 변이형과 병원성이 매우 강한 IBDV의 출현과 관계 있다<sup>13</sup>. 현재 IBDV의 예방은 주로 예방백신에 의존하므로 IBDV 발병지역에서는 그 지역에 유행하고 있는 IBDV의 특성을 규명하는 것이 가장 중요한 일이다. IBDV의 특성규명은 단클론항체를 이용하여 특정 중화 epitope의 유무 또는 변이를 확인하여 왔고<sup>14</sup>, 염기서열 분석은 VP2 gene에 다양한 변이가 일어난다는 것을 보여 주었다<sup>15,16</sup>.

이러한 일련의 IBDV의 유전적인 특성 및 역학에 관한 연구는 외국에서 활발히 수행되고 있으나 국내에서는 항체보유율 조사와 국내분리주의 병원성 조사 등이 매우 제한적으로 수행되어 왔다<sup>17-19</sup>. IBD는 질병 그 자체로 인한 피해와 함께 면역억제로 인한 다른 주요 질병의

감염을 항진시키는 중요한 질병이므로 현재 국내에서 유행하고 있는 IBDV의 특성규명은 질병으로 인한 전체 양계산업의 피해를 줄이는 가장 중요한 요소중 하나로 여겨진다. 본 연구에서는 최근 국내 IBDV 분리주들의 VP2 gene을 RT/PCR로 증폭하여 RFLP pattern을 분석함으로써 최근 국내 분리주의 특성을 규명하였다.

## 재료 및 방법

IBD 바이러스의 분리 : 국내에 유행하는 IBDV를 분리하기 위하여 IBDV 감염이 의심되는 농장의 닭으로부터 F낭을 채취하였다. F낭 유제를 준비하여 발육 계란의 chorioallantoic membrane(CAM)에 접종한 후 IBDV의 분리를 시도하였다<sup>20</sup>. 대조군 바이러스는 1992년에 분리된 병원성 IBDV(SH/92)를 국립수의과학검역원로부터 분양받아 사용하였으며 국내에서 현재 사용하고 있는 3종류의 국내 IBDV 백신(Nok, Dae, Ba)과 5종류의 수입백신(TAD, Bursine-plus, Bur-706, Bursa-vac, Bursa-vac3)을 함께 분석하였다.

IBDV RNA의 분리와 정제 : 접종한 발육 계란의 CAM을 회수하여 PBS(pH 7.4)를 첨가한 후 세 번 얼렸다 녹인 다음, 가위로 세절한 후 조각마쇄기로 처리한 다음 3,000g에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 70,000g에서 1.5시간동안 원심분리후 침전물을 diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리한 증류수에 부유시킨 후 chloroform으로 1회 추출한 다음 RNA를 분리정제하였다. IBDV 백신 바이러스는 백신을 TNE(100mM Tris-HCl [pH 9.0], 100mM NaCl, 1mM EDTA) 완충액에 부유시킨 후 chloroform으로 1회 추출한 다음 RNA를 분리정제하였다. RNA 분리와 정제는 Kwon *et al*<sup>21</sup>의 방법에 의하여 실행하였다. Sodium dodecyl sulfate(최종농도 2%)와 proteinase K(최종농도 250µg/ml)를 chloroform으로 추출한 바이러스 용액에 더하고 55℃에서 5분간 유지시킨 후 acid phenol(pH 4.0)과 chloroform/isoamyl alcohol(49:1)로 추출하였다. 추출된 RNA는 RNaid kit(BIO 101)를 사용하여 정제하였다. 정제한 바이러스 RNA는 DEPC 처리 멸균증류수에 부유한 후 -70℃에 보관하면서 reverse transcriptase(RT) 반응에 이용하였다.

Oligonucleotide primers : 이미 발표된 IBDV의 염기서열을 참고로 합성한 P2.3(5'CCCAGAGTCTACACCATAT3)과 RP5.3(5'TCCTGTTGCCACTCTTTC3) primer를

RT반응과 PCR에 사용하였다<sup>16</sup>. 이 primer들은 VP2 gene의 variable region을 특이적으로 증폭시킬 수 있게 설계되었다.

RT반응과 PCR : IBDV의 double-stranded RNA genome을 denaturation 시키기 위하여 정제한 RNA를 90% dimethyl sulfoxide(DMSO)에 부유시킨 후 98℃에서 5분간 처리하였다. RNA 3-5µl에 5µl의 10X PCR buffer(500mM, 100mM Tris-HCl, pH 9.0, 1.0% Triton X-100), 1µl의 10mM dNTPs, 0.5µl의 10mM DTT, 250ng의 RP5.3 primer, 40 unit의 RNasin, 9µl의 25mM MgCl<sub>2</sub> 그리고 200 unit의 Molony murine leukemia virus RT(GIBCOBRL)를 첨가하고 최종 50 µl의 반응액은 DEPC로 처리한 멸균증류수를 더하여 얻었다. 이렇게 준비한 RT 반응을 위한 혼합액을 37℃에서 90분간 반응시켰다. PCR은 RT반응액 5µl에 10µl의 PCR buffer, 250ng의 P2.3과 RP5.3 primer, 12µl의 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 unit의 Taq DNA polymerase(Promega)를 더하고 최종반응액 100µl는 멸균증류수를 더하여 얻었다. PCR은 94℃에서 1분의 denaturation, 52℃에서 1분의 annealing 그리고 72℃에서 2분의 extension을 한 cycle로 35 cycle 실행하였다. 처음 denaturation과 마지막 extension은 각각 94℃에서 5분, 72℃에서 10분간 실행하였다. 증폭된 PCR 생성물은 ethidium bromide를 함유한 1% agarose gel에서 전기영동하여 분석하였다.

Restriction fragment length polymorphism(RFLP) 분석 : 증폭된 PCR 생성물을 이미 발표된 염기서열을 참고로 선택한 제한 효소들(NEB)로 처리하였다<sup>22,23</sup>. 소화된 PCR 생성물의 RFLP pattern은 2% agarose gel에서 전기영동후 관찰하였다.

## 결 과

IBDV 분리 : 총 5주의 IBDV를 분리하였는데 3주는 산란계(K1, K2, 269) 그리고 2주는 육계(225, 310)로부터 분리하였다. 분리된 바이러스는 계태아의 병변과 IBDV 특이 primer를 이용한 PCR과 conserved region을 인지하는 제한효소를 이용하여 IBDV로 확인하였다.

IBDV의 VP2 gene의 증폭 : IBDV 분리주 5주와 SH/92 그리고 8종류의 백신 reference IBDV의 VP2 gene이 IBDV 특이 primer에 의하여 증폭되었다(Fig 1-A). PCR product의 size는 염기서열을 바탕으로 예상했던 474-bp로 agarose gel 상에서 모두 동일하게 나타나 이 부위에

커다란 insertion이나 deletion은 없는 것으로 보인다.

RFLP pattern 분석 : 발표된 기존의 염기서열을 참고로 하여 선택한 다양한 제한효소들로 PCR product를 처리하여 RFLP profile을 얻었다(Fig 1-B,C,D,E). 이번 연구결과 가장 특징적인 내용은 다양한 제한효소에 의하여 대부분의 국내분리주가 현재 사용되고 있는 백신주와는 구별되는 점이다. 또한 백신 상호간에도 어느 정도 구별이 가능하여 이번 연구결과를 이용하면 현재 야외 계군에서 유행하고 있는 IBDV의 origin을 쉽게 판별할 수 있을 것으로 보인다. 현재 IBDV 백신프로그램의 대부분이 live vaccine을 포함하고 있으므로 야외 IBDV와 백신주의 구별이 중요하다. *Bst*NI에 의하여 백신으로 사용하고 있는 Nok, Ba 그리고 Bursine-plus는 야외분리주인 K1, K2, SH/92, 225, 269, 310과 동일그룹으로 분류되었으나 이들 백신 IBDV는 *Sty*I에 의하여 다른 그룹으로 분류되었다. 백신주인 Bur706과 Bursa-vac은 *Bst*NI에 의하여 각각 독립적인 그룹을 형성하였고 Dae, Bursa-vac3, TAD는 다른 그룹으로 분류되었다. *Sty*I에 의하여 310분리주를 제외한 K1, K2, SH/92, 225, 269 등의 국내분리주는 백신주인 Bursa-vac과 동일한 그룹으로 분류되었고 310분리주는 독립그룹을 형성하였다. 또한 약간의 예외는 있었지만 백신주인 Dae, Bursa-vac3 그리고 TAD는 동일그룹으로 분류되었다.

*Ssp*I에 의하여 IBDV는 K1, K2, SH/92, 225, 269 등의 국내분리주 그룹과 310분리주를 포함한 백신주그룹(Nok, Dae, Ba, Bursine-plus, Bur706, Bursa-vac, Bursa-vac3, TAD)으로 분류되었고 *Taq*I에 의하여는 K1, K2, SH/92, 225, 269 등의 국내분리주 그룹과 310 국내분리주, Dae, Bur706, Bursa-vac, Bursa-vac3, TAD 그룹, Nok, Ba, Bursine-plus 그룹 등 세 그룹으로 분류되었다. 한가지 특이한 점은 야외분리주인 310인데 이 분리주는 *Ssp*I과 *Taq*I에 의하여 다른 백신주와 비슷한 것으로 나타났지만 *Sty*I에 의하여는 독립적인 type으로 나타나 백신주는 아닌 것으로 보인다.

## 고 찰

최근에 기존의 IBDV와는 병원성이나 항원적인 면에서 다른 IBDV가 여러나라에서 보고되고 있다. 미국에서는 중화 단클론항체를 이용한 교차반응에서 항원성이 기존의 IBDV(classical IBDV)와는 다른 변이주(antigenic

Fig 1. Agarose gel electrophoresis of RT/PCR products of the variable region in the VP2 gene of several IBDV isolates and vaccines (A) and RFLP patterns of PCR products digested with *Bst*NI (B), *Spy*I (C), *Ssp*I (D), and *Taq*I (E). (A). Lane 1 & 16=molecular weight markers 100bp and 1kb DNA ladders (GIBCOBRL); lane 2=K1; lane 3=K2; lane 4=SH/92; lane 5=225; lane 6=269; lane 7=310; lane 8=Nok; lane 9=Dae; lane 10=Ba; lane 11=Bur706; lane 12=Bursine plus; lane 13=Bursa-vac3; lane 14=Bursa-vac; lane 15=TAD. (B). Lane 1 & 16=molecular weight markers 100bp and 1kb DNA ladders; lane 2=K1; lane 3=K2; lane 4=SH/92; lane 5=225; lane 6=269; lane 7=310; lane 8=Nok; lane 9=Ba; lane 10=Bursine-plus; lane 11=Dae; lane 12=TAD; lane 13=Bursa-vac3; lane 14=Bur706; lane 15=Bursa-vac. (C). Lane 1 & 16=molecular weight markers 100bp and 1kb DNA ladders; lane 2=K1; lane 3=K2; lane 4=SH/92; lane 5=225; lane 6=269; lane 7=310; lane 8=Nok; lane 9=Dae; lane 10=Ba; lane 11=Bur706; lane 12=Bursine-plus; lane 13=Bursa-vac3; lane 14=Bur-vac; lane 15=TAD. (D). Lane 1 & 16=molecular weight markers 100bp and 1kb DNA ladders; lane 2=K1; lane 3=K2; lane 4=SH/92; lane 5=225; lane 6=269; lane 7=310; lane 8=Bursa-vac3; lane 9=Bursa-vac; lane 10=Bur706; lane 11=Dae; lane 12=TAD; lane 13=Nok; lane 14=Bursine-plus; lane 15=Ba.

variant)가 확인되었다<sup>14,23</sup>. 유럽에서는 항원성의 큰 변화 없이 병원성이 매우 강한(highly virulent, HV) IBDV가 나타나고 있다<sup>25</sup>. 이렇게 병원성이 매우 강한 HV-IBDV는 일본과 중국에서도 확인되고 있다<sup>16,26</sup>. 국내에서도 1992년에 높은 폐사율을 보인 9주령의 산란계에서 병원성이 강한 IBDV가 확인된 이후 IBDV에 의한 피해가 확인되고 있다<sup>19</sup>.

본 연구에서 IBDV는 산란계와 육계에서 고루 분리되었는데 K1, 269는 각각 8, 4주령의 산란계에서, 225, 269, 310은 각각 3, 4, 7주령의 육계에서 분리되었다. 이렇게 분리되는 양상으로 볼 때 IBDV는 산란계와 육계에 관계 없이 넓은 감염시기를 가지고 피해를 주는 것으로 보인다. 유럽 HV-IBDV인 849VB를 가지고 38일령의 닭에서 한 실험결과에 의하면 산란계와 육계에서 각각 60%와 20%의 치사율을 나타내어 중별로 차이가 있음을 보여주었다<sup>25</sup>.

모든 국내분리주와 백신주는 VP2 gene의 variable region을 증폭하도록 설계된 IBDV 특이 primer pair에 의하여 증폭되었다. 증폭된 PCR product는 모두 동일한 크기를 나타내어 증폭된 부위에 염기의 커다란 deletion이나 insertion이 없는 것으로 보인다. 국내에서 분리된 IBDV와 백신주의 VP2 gene의 474-bp region에서 염기서열의 차이점을 RT/PCR-RFLP pattern을 비교하여 분석하였다. 다양한 제한효소를 사용한 RFLP profile은 항원성을 포함한 표현형의 차이와 분리주의 병원성과 밀접한 연관성을 갖는 것으로 나타났다<sup>27-29</sup>. Quin과 Kibenge<sup>30</sup>는 IBDV의 segment A의 cDNA를 제한효소로 분석하여 IBDV 분리주를 항원적 특성과 지역적 분포에 따라 분류하였으며 Jackwood와 Sommer<sup>29</sup>는 백신 바이러스와 비교하였을 때 야외분리주에서 보다 광범위한 유전적 변이가 일어나고 있음을 restriction profile로 밝혔다. 본 연구에서 국내 IBDV 분리주들은 사용한 대부분의 제한효소들에 의하여 백신주들과 구별되었다. *Bst*NI에 의하여 모든 국내 분리주는 백신주인 Nok, Ba, Bursine-plus와 한 그룹으로 분류되었다. 그러나 이들 백신주들은 *Spy*I과 *Taq*I에 의하여 독립적인 그룹으로 분류되었다. Bur706과 Bursa-vac은 *Bst*NI에 의하여 고유한 RFLP profile을 가지고 있어 야외분리주 또는 다른 백신주들과의 감별이 가능하였다. *Spy*I에 의하여 310은 다른 모든 IBDV와 구별되었는데 이 분리주는 *Spy*I에 의한 인지부위를 가지고 있지 않은 것으로 나타났다. *Spy*I에 의한 restriction profile에서 모

든 PCR product의 restriction fragment의 합은 474-bp 이하 여야 하는데 백신주인 Bursine-plus, Nok, Ba 등의 restriction fragment의 합은 474-bp 이상 되는 것으로 나타났다. 이는 제한효소에 의한 부분소화 또는 유전적으로 염기서열이 변하여 제한효소에 의한 인지 부위가 다른 IBDV가 혼합되어 있기 때문인 것으로 보이는데 이들은 plaque purification 또는 limiting dilution법을 이용하여 동종의 바이러스를 분리하여 제한효소에 의한 인지부위를 확인하여야 할 것으로 여겨진다.

310 분리주를 제외한 모든 국내분리주는 제한효소 SspI과 TaqI에 의한 restriction profile에 의하여 백신주들과 구별되었다. SspI에 의하여 310을 제외한 국내분리주는 201-bp와 273-bp의 분절을 보이는데 반해 국내분리주인 310과 백신주들은 소화되지 않았다. TaqI에 의하여 301을 제외한 국내분리주는 96-bp와 378-bp의 분절을 보였고 310, Dae, Bur706, Bursa-vac, Bursa-vac3, TAD는 인지부위를 가지고 있지 않았다. 그리고 Nok, Ba, Bursine-plus는 소화되었지만 나타난 분절은 다른 분리주들과 달랐다. 국내에서 분리된 K1, K2, SH/92, 225, 269 분리주들의 SspI과 TaqI에 의한 restriction profile은 일본에서 분리된 병원성이 매우 강한 IBDV의 restriction profile<sup>16</sup>과 최근 중국에서 분리된 HV-IBDV인 F9502와 G9201의 염기서열 분석결과에 의한 restriction file과 동일하였다<sup>26</sup>. 감염실험에서 국내분리주인 SH/92는 닭에서 병원성이 매우 강한 것으로 나타났다<sup>19</sup>. 나머지 분리주들은 닭에서 병원성 실험을 하지는 않았지만 restriction profile이 동일한 것으로 나타나 SH/92와 유사한 병원성을 가질 것으로 추정된다. 이상의 결과로 보아 RT/PCR로 야외분리주의 VP2 gene을 증폭하여 특정 제한효소로 처리하면 빠르게 야외분리주의 병원적 특성을 파악할 수 있고 백신주와의 감별이 가능할 것으로 보인다. 앞으로 보다 많은 수의 국내분리주를 대상으로 하여 restriction profile을 작성하고 분리주의 정확한 염기서열 분석이 이루어지면 국내에서 분리되는 IBDV의 유전적인 특성에 대하여 좀 더 자세한 정보를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

국내에서 분리되는 IBDV의 유전적 특성을 파악하기 위하여 IBV로 의심되는 닭의 F낭으로부터 IBDV를 분리하여 RT/PCR-RFLP로 분석하였다. F낭을 계태아의 CAM

에 접종하여 총 5주의 IBDV를 분리하였다. 분리주와 현재 국내에서 사용하는 백신 IBDV의 VP2 gene의 variable region을 RT/PCR로 증폭시킨 다음 restriction profile을 비교 분석하였다. 분리주와 백신주들은 모두 474-bp의 PCR product를 나타내었다. 제한효소 BstNI과 StyI에 의하여 국내분리주와 백신주들은 4그룹으로 분류되었는데 국내 분리주들의 restriction profile은 백신주들과 다르게 나타났으며 백신 상호간에도 서로 다른 restriction profile을 보여 부분적으로 구별이 가능하였다. SspI과 TaqI은 병원성이 매우 강한 IBDV의 VP2 gene에 특정 인지부위를 가지고 있는데 310분리주를 제외한 모든 국내분리주는 병원성이 매우 강한 IBDV restriction profile을 나타내어 국내에서도 병원성이 매우 강한 IBDV의 존재가능성을 확인할 수 있었고 백신 IBDV와의 감별도 가능하였다. 이러한 결과로 볼 때 국내 IBDV에서 다양한 유전적 변이가 일어나고 있는 것으로 추정된다.

## 참 고 문 헌

1. Lukert PD, Saif YM. Infectious bursal disease. In: *Disease of poultry*, 9th ed., Calnek, BW *et al.*, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp.648-663, 1991.
2. Murphy FA, Fauquer CM, Bishop DHL, *et al.* *Virus taxonomy*. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer, New York(Arch. Virol. Suppl. 10). pp.240-244, 1995
3. Azad AA, Barrett SA, Fahey KJ. The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus. *Virology*, 143:35-44, 1985.
4. Dobos P, Hill BJ, Hallet R, *et al.* Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded genomes. *J Virol*, 32:593-605, 1979.
5. Hudson PJ, McKern, NM, Power BE, *et al.* Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acids Res*, 14:5001-5012, 1986.
6. Mundt E, Beyer J, Muller H. Identification of a novel

- viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J Gen Virol*, 76:437-443, 1995.
7. Jackwood DJ, Saif YM, Hughes JM. Characteristics and serologic studies of two serotypes of infectious disease virus in turkeys. *Avian Dis*, 26:871-882, 1982.
  8. Jackwood DH, Saif YM. Antigenic diversity of infectious bursal disease virus. *Avian Dis*, 31:766-770, 1987.
  9. Cummings TS, Broussard CT, Page RK, et al. Infectious bursal disease virus in turkeys. *Vet Bull*, 56: 757-762, 1986.
  10. Ismail NM, Saif YM, Moorhead PD. Lack of pathogenicity of five serotype 2 infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*, 32:757-759, 1988.
  11. McFerran JB, McNulty MS, Mckilhop ER, et al. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: demonstration of second serotype. *Avian Patho*, 9:395-404. 1980
  12. Weyth PJ, Cullen GA. Transmission of immunity from inactivated infectious bursal disease oil-emulsion vaccinated parent chickens to their chicks. *Vet Rec*, 102: 362-363, 1978.
  13. Rosenberger JK, Cloud SS, Metz A. Use of infectious bursal disease virus variant vaccines in broilers and broiler breeders. *Proceeding of 36th West Poultry Dis Con*, pp.105-109, 1987.
  14. Snyder DB, Lana DP, Savage PK, et al. Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: Evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. *Avian Dis*, 32:535-539, 1988.
  15. Bayliss CD, Spies U, Shaw K, et al. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J Gen Virol*, 71:1303-1312, 1990.
  16. Lin Z, Kato A, Otaki Y, et al. Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis*, 37:315-323, 1993.
  17. 이영옥, 김순재, 최정옥 등. 국내종계의 Infectious bursal disease virus의 감염상황 및 분리주의 생물학적 특성. 농사시험연구보고서(가축위생). 23:136-142, 1981.
  18. 모인필, 김재홍, 권준현 등. 최근의 강독형 IBD 발생 양계단지에 대한 IB D 예방접종프로그램 작성 및 현지적용 연구. 가축위생연구소 시험연구보고서(가축위생). pp. 305-310, 1993.
  19. 권용국, 모인필, 성환우 등. 전염성 F낭염 바이러스 국내 분리주 SH/92의 병원성 연구. 농업논문집, 37: 637-647, 1995.
  20. Rosenberger JK. Infectious bursal disease. In: *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*, 3rd ed., Purchase HG et al, eds. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa. pp. 165-166, 1989.
  21. Kwon HM, Jackwood MW, Gelb J Jr. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis*, 37:194-202, 1993.
  22. Kibenge FSB, Jackwood DJ, Mercado CC. Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, 71:569-577, 1990.
  23. Kibenge FSB, McKenna PK, Dybing JK. Genome cloning and analysis of the large RNA segment(Segment A) of a naturally avirulent serotype 2 infectious bursal disease virus. *Virology*, 184:437-440, 1991.
  24. Snyder DB. Changes in the field status of infectious bursal disease virus. *Avian Patho*, 19:419-423, 1990.
  25. Van den Berg TP, Gonze M, Meulemans G. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterisation of a highly virulent strain. *Avian Patho*, 20: 133-143, 1991.
  26. Cao YC, Yeung WS, Law M, et al. Molecular characterization of seven chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains. *Avian Dis*, 42:340-351, 1998.
  27. Liu HJ, Giambrone JJ, Dormitorio T. Detection of genetic variations in serotype I isolates of infectious bursal disease virus using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *J Virol Methods*, 48:281-291, 1994.

28. Jackwood DJ, Sommer SE. Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*, 41:627-637, 1997.
29. Jackwood DJ, Sommer SE. Genetic heterogeneity in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses detected in commercially reared chickens. *Avian Dis*, 42: 321-339, 1998.
30. Qian B, Kibenge FSB. Restriction fragment profiles of genome segment A of infectious bursal disease virus correlate with serotype and geographical origin of avian birnaviruses. *Can J Microbiol*, 42:93-97, 1996.
-