

Detection of Very Virulent Infectious Bursal Disease (IBD) in Chicken in West Java

Ajeng Fabeane Putri, Agus Winarsongko, Heri Hoerudin, Gita Sekarmila, Ahpas, Jejen Jaelani, Wawan Gunawan, Rina Dewiyanti, Yuda Pratama, Harimurti Nuradji*, Nuha Fairusya, Fitrine Ekawasti, Rahmat Setya Adji, NLP Indi Dharmayanti, Risa Indriani, Bambang Ngaji Utomo, Sri Suryatmiati

Pusat Riset Veteriner, Organisasi Riset Kesehatan, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Indonesia

*Corresponding author: harimurti.nuradji@gmail.com

ABSTRACT

Infectious Bursal Disease (IBD), also known as Gumboro disease, is an acute, highly contagious disease that infects chickens and causes a high mortality rate of up to 100% in young animals. The disease is caused by Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) of the genus Avibirnavirus, family Birnaviridae. The disease has been reported in Indonesia since 1976, and management strategies for the disease, such as vaccination, have been applied to prevent and control outbreaks in poultry farms. In this study, we conducted the detection of the disease in chickens from a farm in West Java with a mortality rate of 80%. Chickens showing clinical signs, such as sudden death, anorexia, watery diarrhea, and ruffled feathers, were necropsied, and organ samples, including the bursa Fabricius, brain, and spleen, were collected. The samples were then tested using Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) to confirm the diagnosis of IBD. Positive results were obtained in this study, highlighting the need for improved biosecurity in poultry farms in Indonesia. These results also provided a basis for further research on viral characterization to develop detection kits or vaccines for IBD using local isolates from the field in Indonesia.

Keywords: IBD, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, isolation, chicken, Indonesia

PENDAHULUAN

Penyakit Bursal Menular, juga dikenal sebagai penyakit Gumboro merupakan penyakit akut yang sangat menular yang menginfeksi ayam dan menyebabkan angka kematian yang tinggi hingga 100% pada hewan muda. Penyakit ini disebabkan oleh *Infectious Bursal Disease Virus (IBD)* dari genus Avibirnavirus, famili Birnaviridae. Virus tersebut mempunyai RNA beruntai ganda linier dan dua protein struktural, VP2 dan VP3, juga VP4 sebagai protease serin. Penyakit ini telah dilaporkan di Indonesia sejak tahun 1976 (Akiba *et al.* 1976), dan sejak itu penyakit ini masih banyak ditemukan di peternakan unggas di Indonesia. Virus ini menginfeksi organ limfoid, terutama bursa fabrisius, meskipun organ imun lain juga terlibat (Van den Berg *et al.* 2000).

Virus IBD memiliki 2 serotipe, yaitu IBDV serotipe 1 dan IBDV serotipe 2.

IBDV serotipe 1 merupakan virus yang bersifat patogen pada unggas, sedangkan IBDV serotipe 2 mampu menimbulkan respons antibodi namun tidak menimbulkan gejala klinis bila infeksi terjadi pada ayam dan kalkun (Lukert dan Saif, 2003). Strain yang sangat virulent (*Very Virulent*) termasuk dalam serotipe 1 yang ditandai dengan munculnya gejala klinis yang berat dan angka kematian yang bervariasi antara 60-100%. Virus vvIBD sangat ganas sehingga menyebabkan angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Morbiditas pada ayam SPF (*Specific Pathogen Free*) dapat mencapai 100% pada infeksi buatan (Ignjatovic *et al.* 2004), sedangkan pada kasus lapangan mortalitas mencapai 56,09% pada ayam broiler dan 25,08% pada ayam petelur (Zelege *et al.* 2005). vvIBD mampu menembus sistem kekebalan tubuh dari antibodi induk dan menghasilkan gejala klinis mirip dengan strain klasik dan memiliki masa inkubasi yang sama yaitu 4

hari, namun fase akut lebih parah dan menyebar lebih cepat pada kawanan (Tang dan Saif, 2004).

Vaksinasi merupakan salah satu upaya yang dapat dilakukan dalam melindungi ayam dari infeksi virus IBD (Müller *et al.* 2003; Soeijar, 2004; Block *et al.* 2007; OIE, 2008). Di Indonesia, beberapa vaksin IBD dengan menggunakan isolat lokal telah banyak digunakan oleh peternak, namun kejadian penyakit masih terjadi di beberapa daerah di Indonesia. IBD menyebabkan kerugian ekonomi yang besar pada industri perunggasan yaitu angka mortalitas dan morbiditas yang meningkat pada ayam akibat immunosupresif, oleh karena itu, deteksi dini terhadap virus IBD sangat diperlukan untuk mencegah penyebaran virus tersebut sebagai Upaya pengendalian dini. Salah satu metode identifikasi cepat yang dilakukan ialah *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR). Teknik RT-PCR telah dikembangkan untuk mendeteksi genom virus IBD (Ashraf *et al.* 2007). Metode RT-PCR mampu mendeteksi genom virus IBD yang tidak dapat tumbuh di dalam biakan sel, dan tidak diperlukan propagasi virus sebelum proses amplifikasi (Wibowo *et al.* 2015). Pada penelitian ini akan melakukan deteksi penyakit IBD yang Sangat Virulen pada Ayam di Jawa Barat dengan menggunakan metode isolasi virus dan RT-PCR.

MATERI DAN METODE

Sampel Penelitian

Sampel organ berupa bursa fabricius, otak dan limpa dikoleksi dari beberapa ayam yang menunjukkan gejala klinis di peternakan ayam di wilayah Bogor dan Ciamis, Jawa Barat. Pengambilan sampel dilakukan berdasarkan dari metode Organisasi Kesehatan Hewan Dunia dengan sedikit modifikasi (OIE, 2008). Ayam yang menunjukkan gejala klinis IBD dinekrops

dan diambil sampel organnya. Sampel dimasukkan ke dalam media Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) dan antibiotik (penicillin 1000 iu/mL dan streptomycin 1000 µg/mL). Sampel yang telah dikoleksi kemudian disimpan pada suhu -70 °C sebelum diproses lebih lanjut.

Deteksi dan Isolasi Virus IBD

A. Penyiapan Sampel

Organ yang dikoleksi digerus menggunakan mortar dan pestle. Sampel yang telah digerus dimasukkan ke dalam media (DMEM) dan antibiotik (penicillin 1000 iu/mL dan streptomycin 1000 µg/mL). Sampel yang telah dihaluskan kemudian disimpan pada suhu -70 0 C sebelum diuji.

B. *Reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR).

Deteksi virus IBD dilakukan dengan menggunakan metode *reverse transcriptase* PCR, Total RNA diekstraksi dari sampel yang telah dihaluskan menggunakan *Geneaid Total RNA extraction kit* (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) sesuai dengan petunjuk yang ada. Secara singkat, 0.2 mL supernatan ditambahkan ke dalam tube 0.5 ml yang berisi alkohol 70% dan 4 µL betamercapto ethanol. Sampel kemudian ditambahkan ke dalam reagen Geneaid, dicuci dan RNA dielusi menggunakan 50 µL *RNAse free water*.

Uji RT-PCR dilakukan dengan mengikuti prosedur dari *Verso 1-Step RT-PCR Hot-Start Kit* (Thermo Fisher Scientific, Inc). Secara singkat, 3 µL RNA virus digunakan sebagai template dalam 20 µL reaksi yang mengandung *Verso Enzyme Mix*, *2X 1-Step PCR Hot-Start Master Mix*, *RT Enhancer*, *Primer* dan *Nuclease Free Water*. Primer yang digunakan adalah IDT vv-rp1028 specific primer 5'-GCT TGG AAT CAC AAT-3'. Sintesa cDNA dilakukan dengan inkubasi pada suhu 50°C

selama 15 menit, diikuti dengan inaktivasi verso pada suhu 95 °C selama 15 menit. PCR dilakukan dengan 35 siklus yang meliputi: *denaturation* (95 °C selama 20 detik), *annealing* (50 °C selama 30 detik), *extention* (72 °C selama 1 menit). *Final extention* dilakukan pada suhu 72 °C selama 5 menit. Konfirmasi produk PCR dilakukan dengan elektroforesis menggunakan 5 µL produk PCR pada 100 V selama 1 jam pada agarose 1.5% dalam 1 x Tris Buffer. Visualisasi dilakukan dengan pewarnaan menggunakan *flourosafe* dan *transluminator ultraviolet*.

C. Isolasi Virus

Sampel organ yang telah dihaluskan kemudian divorteks sekitar 5 detik kemudian disentrifuse selama 5 menit pada kecepatan 2500 rpm. Secara singkat 0.2 ml supernatan diinokulasikan melalui membran chorioalantois dari telur ayam berembrio umur 9-11 hari. Telur yang sudah diinokulasi dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37 °C dan diamati selama 5 hari. Telur yang mati dan hidup selama waktu pengamatan kemudian dilihat

perubahan pada membran chorioalantois dan embrionya. Virus IBD biasanya akan menimbulkan plak pada membran chorioalantois dan juga perubahan pada embrio yang berupa: embrio mengecil, oedema subkutan, pembengkakan pembuluh darah, pendarahan subkutan pada kepala dan badan. Hati membengkak dan berwarna kehijauan, limpa membesar dan ginjal membesar disertai kongesti (Lukert & Saif, 2003; OIE, 2008).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Virus IBD

Sampel yang diperoleh berasal dari kegiatan lapangan yang dilakukan di Ciamis dan Bogor, Jawa Barat, Indonesia. Dari kedua Kabupaten tersebut diperoleh sampel organ dari peternakan ayam broiler. Sampel organ yang diisolasi dari ayam sakit yang berasal dari Kabupaten Bogor berjumlah 2 sampel dan dari Kabupaten Ciamis sebanyak 5 sampel, yang diuji dengan menggunakan isolasi virus dan test PCR. Hasil isolasi virus dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Hasil isolasi untuk mendeteksi virus IBD dari organ bursa fabrisius dan otak ayam yang menunjukkan gejala klinis.

Peternakan	Jenis Ayam	Organ	Kabupaten	Hasil Isolasi
Peternakan A	Broiler	1 Bursa	Bogor	Negatif
Peternakan B	Broiler	1 Bursa	Bogor	Positif
Peternakan C	Broiler	1 Bursa	Ciamis	Positif
Peternakan D	Pejantan	2 Bursa (pool)	Ciamis	Positif (1)
		2 Otak (pool)		Positif (1)



Gambar 1 Perubahan yang terlihat pada embrio ayam setelah diinfeksi dengan sampel bursa fabrisius yang terinfeksi. (A) Plak pada membrane chorioallantois, (B) Embrio mengecil dan hati berwarna pucat, (C) Pendarahan subkutan

Sampel IBD pada penelitian ini adalah bursa fabrisius (BF) karena merupakan sampel terbaik untuk mengisolasi virus IBD (Butt *et al.* 2015). BF merupakan organ utama yang berhubungan dengan pathogenesis virus IBD dan telah dikenal sebagai sumber antigen yang baik (Singh *et al.* 2015). Uji isolasi virus merupakan salah satu yang digunakan untuk mendeteksi virus IBD (Rosenberger *et al.* 1998; Lukert dan Saif, 2003; OIE, 2008). Walaupun uji ini sensitive, namun pelaksanaannya lama dan prosedurnya relative sulit karena inokulasi dilakukan melalui membrane korioalantois (CAM) (Gambar 1).

Hasil infeksi pada CAM adalah lesi yang diamati, antara lain: adanya plak pada CAM (Mutinda *et al.* 2015), embrio yang mengecil, pendarahan subkutan, dan perubahan hati yang merupakan perubahan yang menjadi ciri infeksi virus IBD pada telur embrionasi (Lukert dan Saif, 2003; OIE, 2008). Seperti yang terjadi di virus IBD, virus cacar burung dan virus ILT juga menyebabkan timbulnya plak pada membrane, hal ini disebabkan karena beberapa virus unggas yang diperbanyak melalui CAM umumnya menghasilkan luka yang serupa (Wibowo, 2003). Untuk membedakan karakter lesi membrane bagi keperluan diagnostik, perlu dilanjutkan

dengan pemeriksaan mikroskopis untuk melihat lesi dari masing-masing virus. Pada infeksi virus ILT pada CAM dapat ditemukan benda inkubasi intranuclear, sedangkan pada virus cacar ditemukan benda inklusi intracytoplasmic yang disebut juga dengan badan bohringer (Trypathy dan Read, 2003). Pada infeksi virus IBD, tidak ditemukan lesi spesifik seperti yang ditunjukkan oleh virus cacar dan virus ILT (Lukert dan Saif, 2003).

Menurut Mutinda *et al.* (2015) lesi embrio ayam yang terinfeksi virus IBD menunjukkan variasi lesi yaitu: embrio kerdil, kongesti, edema dan embrio berdarah. Hal ini ditunjukkan pada hasil inokulasi pada TAB yang menghasilkan lesi embrio antara lain: embrio menyusut dan kulit pucat (Gambar 1B), dan pendarahan subkutan (Gambar 1C). Lesi embrio yang diinokulasi virus IBD pada dasarnya mirip dengan embrio ayam yang terinfeksi virus ND (Wibowo *et al.* 2012), dan AI (Wibowo *et al.* 2007). Perbedaannya dengan kasus AI terletak pada adanya lesi hemoragik dan kerontokan rambut yang lebih banyak (Wibowo *et al.* 2007). Demikian pula pada embrio yang terinfeksi virus ND, terjadi perdarahan embrionik lebih banyak (Putra *et al.* 2012). Kasus lesi IB cenderung lebih mirip, namun dwarfisme lebih jelas terlihat

jika embrio kontrol dan embrio yang terinfeksi diinkubasi hingga 19 hari (Cavanagh dan Naqi, 2003).

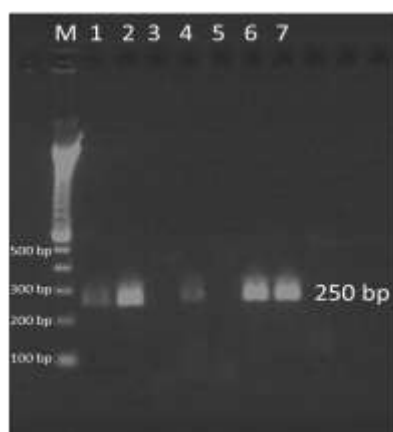
Deteksi Virus IBD

Metode *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR) sebelumnya telah dikembangkan untuk mendeteksi virus dan dapat dilakukan dalam waktu yang relative lebih cepat dibandingkan metode isolasi. Hasil pada Tabel 2 menunjukkan bahwa sampel yang diuji menghasilkan hasil positif terutama sampel bursa dari peternakan B, C, dan D, sedangkan pada

sampel yang diambil dari peternakan D terdapat 1 hasil positif dari sampel otak. Hasil RT-PCR ini menunjukkan hasil yang sama dengan isolasi virus, dimana semua sampel yang diuji menunjukkan hasil yang sama (Gambar 2). Hal ini sedikit berbeda dengan penelitian Cardoso *et al.* (2008) yang menunjukkan bahwa RT-PCR memiliki sensitivitas yang lebih tinggi (81%) dibandingkan dengan isolasi virus (73%). Hal ini terkait dengan perbedaan organ yang dikumpulkan dan penggunaan strain IBD yang berbeda.

Tabel 2 Hasil PCR untuk mendeteksi virus IBD dari organ bursa fabrisius dan otak ayam yang menunjukkan gejala klinis.

Peternakan	Jenis Ayam	Organ	Kabupaten	Hasil PCR
Peternakan A	Broiler	1 Bursa	Bogor	Negatif
Peternakan B	Broiler	1 Bursa	Bogor	Positif
Peternakan C	Broiler	1 Bursa	Ciamis	Positif
Peternakan D	Pejantan	2 Bursa (pool)	Ciamis	Positif (1)
		2 Otak (pool)		Positif (1)



Gambar 2 Analisis PCR dari sampel organ bursa dan otak yang menunjukkan gejala klinis menggunakan gel elektroforesis

Pada umumnya identifikasi virus IBD banyak difokuskan pada amplifikasi gen VP2. Protein VP-2 dianggap penting karena mempunyai tapak antigenik yang bertanggung jawab dalam menstimulasi antibodi netralisasi sehingga dapat menimbulkan antibodi yang bersifat imunoprotektif (Van den Berg, 2000). Dua epitope netralisasi yang terdapat pada polipeptida VP2 virus IBD tersebut (Mahgoub, 2012). Hasil amplifikasi fragmen gen VP2 terhadap lima sampel bursa fabrisius dalam penelitian ini Hasil menunjukkan bahwa RNA virus IBD dapat terdeteksi dari organ yang diuji, kecuali tiga organ (otak dan bursa) dari peternakan A dan D, dengan mengamplifikasi produk sekitar 250 bp (Gambar 2).

Hasil amplifikasi terlihat sama dengan kontrol positif yang digunakan (isolat IBD Dramaga, Bogor). Sementara kontrol negatif tidak menunjukkan hasil amplifikasi produk. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menggunakan primer yang sama, dimana produk amplifikasi yang dihasilkan terlihat sekitar 250 bp (Kabell *et al.* 2005; Kusk *et al.* 2005). Hasil negatif pada organ otak dan bursa yang terlihat pada peternakan D mungkin dikarenakan organ yang diambil telah melewati periode infeksi akut pada ayam, sehingga virus hanya dapat terdeteksi pada organ-organ tertentu. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya mengenai deteksi virus pada beberapa organ limfoid dimana virus terdeteksi lebih lama, 22 hari setelah infeksi pada organ bursa dibandingkan dengan organ limpa yang hanya terdeteksi inkonsisten selama 10 hari setelah infeksi menggunakan uji *reverse transcriptase* PCR (Barlič-Maganja *et al.* 2002). Hal ini menunjukkan bahwa dalam pengujian untuk mendeteksi virus IBD pemilihan sampel merupakan faktor yang penting untuk mendapatkan hasil yang optimal. Bursa fabrisius memberikan hasil

yang baik dibandingkan dengan organ otak dan limpa terutama untuk pengambilan sampel yang dilakukan dalam periode yang lebih lama.

Dibandingkan dengan uji isolasi virus, uji RT-PCR memberikan hasil yang lebih cepat dan menunjukkan hasil yang sama untuk mendeteksi virus IBD. Teknis diagnosis secara molekuler tersebut mempunyai kemampuan deteksi sangat akurat, sensitif, cepat, dan dapat digunakan menggantikan diagnosis mikrobiologi *in vivo* dan *in vitro* (Lin *et al.* 1994; Barlič-Maganja *et al.* 2002).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa 3 sampel dari 7 sampel yang berasal dari Jawa Barat, Indonesia positif virus IBD yang diuji dengan isolasi virus dan RT-PCR. Hasil positif dari penelitian ini, menyoroti pentingnya peningkatan biosekuriti pada peternakan unggas di Indonesia. Hasil ini juga menjadi dasar penelitian lebih lanjut mengenai karakterisasi virus untuk mengembangkan alat deteksi atau vaksin virus IBD menggunakan isolat lokal dari lapangan di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Akiba, K., Itwatsuki, K., Sasaki, Y., Furuya & Ando, Y. (1976). Report on The Investigation Poultry Disease In Indonesia. *Japan International Cooperation Agency*.
- Ashraf, S., Tang, Y., & Saif, Y. M. (2007). Development of differential RT-PCR assays and molecular characterization of the complete VP1 gene of five strains of very virulent infectious bursal disease virus. *Avian diseases*, 51(4), 935-941.
- Barlič-Maganja, D., Zorman-Rojs, O., & Grom, J. (2002). Detection of infectious bursal disease virus in different lymphoid organs by single-step reverse transcription polymerase chain reaction and microplate hybridization assay. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 14(3), 243-246.
- Cardoso, T. C., Rosa, A. C., Astolphi, R. D., Vincente, R. M., Novais, J. B., Hirata, K. Y., & Luvizotto, M. C. R. (2008). Direct detection of infectious bursal

- disease virus from clinical samples by in situ reverse transcriptase-linked polymerase chain reaction. *Avian Pathology*, 37(4), 457-461.
- Cavanagh, D., & Naqi, S. (2003). Infectious bronchitis. *Diseases of poultry*, 11, 101-119.
- Ignjatovic, J., Sapats, S., Reece, R., Gould, A., Gould, G., Selleck, P., & Westbury, H. (2004). Virus strains from a flock exhibiting unusually high mortality due to infectious bursal disease. *Australian veterinary journal*, 82(12), 763-768.
- Kusk, M., Kabell, S., Jørgensen, P. H., & Handberg, K. J. (2005). Differentiation of five strains of infectious bursal disease virus: Development of a strain-specific multiplex PCR. *Veterinary microbiology*, 109(3-4), 159-167.
- Lin, T. L., Wu, C. C., Rosenberger, J. K., & Saif, Y. M. (1994). Rapid differentiation of infectious bursal disease virus serotypes by polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6(1), 100-102.
- Lukert, P.D. & Saif, Y.M. (2003). *Infectious Bursal Disease. In: Disease of Poultry*, 11th ed, Saif Y.M (ed). Iowa: Iowa State University Press.
- Mahgoub, H. A. (2012). An overview of infectious bursal disease. *Archives of virology*, 157, 2047-2057.
- Mutinda, W. U., Njagi, L. W., Nyaga, P. N., Bebola, L. C., Mbuthia, P. G., Kemboi, D., & Muriuki, A. (2015). Isolation of infectious bursal disease virus using indigenous chicken embryos in Kenya. *International scholarly research notices*, 2015(1), 464376.
- Putra, H. H., Wibowo, H., Untari, T., & Kurniasih, K. A Study of Macroscopic and Microscopic Lesions of Chicken Embryos Infected by Virulent Newcastle Disease Virus Field Isolates. *Jurnal Sain Veteriner*, 30(1).
- Rosenberger, J.K., Saif, Y.M., & Jackwood, D.J. (1998). *Infectious Bursal Disease. In: Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM, editors. A Lab Man Isol Identif Avian Pathog. 4th ed. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists.*
- Singh, J., Banga, H. S., Brar, R. S., Singh, N. D., Sodhi, S., & Leishangthem, G. D. (2015). Histopathological and immunohistochemical diagnosis of infectious bursal disease in poultry birds. *Veterinary World*, 8(11), 1331.
- Tang, Y., & Saif, Y. M. (2004). Antigenicity of two turkey astrovirus isolates. *Avian diseases*, 48(4), 896-901.
- Tripathy, N.D. & Reed, W.M. (2003). *Pox In : Disease of Poultry*, 11th ed. Saif, Y.M (Ed). Iowa: Iowa State University Press.
- OIE. 2008. *Infectious Bursal Disease*. OIE Terr Man [Internet]. 30:17. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01652176.2008.9697673>.
- Berg, T. P. V. D. (2000). Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian pathology*, 29(3), 175-194.
- Wibowo, M. H. (2003). Identifikasi Serologis Virus Infectious Laryngotracheitis Isolat Mangestoni Farm Dengan Uji Agar Gel Presipitasi Dan Uji Netralisasi. *Jurnal Sain Veteriner*, 21(2).
- Wibowo, M. H., Susetya, H., Untari, T., Wahyuni, A. E. T. H., Tabbu, C. R., & Asmara, W. (2007). Identifikasi Molekuler Virus Avian Influenza Yang Diisolasi Dari Kasus Dengan Dan Tanpa Gejala Klinis Khas Penyakit Avian Influenza. *J. Vet*, 8(3), 103-110.
- Wibowo, M. H., Untari, T., & Wahyuni, A. E. T. H. (2012). Isolasi, identifikasi, sifat fisik, dan biologi virus tetelo yang diisolasi dari kasus di lapangan. *Jurnal Veteriner*, 13(4), 425-433.
- Wibowo, M. H., Fadiar, R., Anggoro, D., Artanto, S., Amanu, S., & Wahyuni, A. E. T. H. (2017). Deteksi Molekuler Virus Infectious Bursal Disease (IBD) pada Samp l Bursa Fabrisius yang Diperoleh dari Ayam Terdiagnosa Penyakit IBD. *Jurnal Sain Veteriner*, 33(2).
- Zeke, A., Gelaye, E., Sori, T., Ayelet, G., Sirak, A., & Zekarias, B. (2005). Investigation on infectious bursal disease outbreak in Debre Zeit, Ethiopia. *International Journal of poultry science*, 4(7), 504-506.