

УДК: 57.088.1:577.215.3:578.222:578.223:608.2
DOI:10.52419/issn2072-2419.2025.4.107

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ПЦР-АНАЛИЗА В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ И ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЦЫПЛЯТ

Семина А.Н.* – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотр. отдела молекулярно-биологических исследований (ORCID 0000-0001-7641-9105); Дмитриев К.Ю. – канд. ветеринар. наук, стар. науч. сотр. отдела молекулярно-биологических исследований (ORCID 0000-0001-9741-3247)

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт
птицеводства (ВНИВИП) – филиал ФГБНУ ФНЦ «ВНИТИП»

* anna14.05@mail.ru

Ключевые слова: вирус, птица, инфекция, диагностика, ПЦР, ДНК, РНК, генном, болезнь Гамборо, инфекционная анемия цыплят.

Key words: virus, bird, infection, diagnosis, PCR, DNA, RNA, gene, Gumboro disease, infectious chicken anaemia.

Финансирование: Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства сельского хозяйства Российской Федерации (тема № 1022041100550-5-4.3.1).

Поступила: 18.07.2025

Принята к публикации: 05.12.2025

Опубликована онлайн: 26.12.2025



РЕФЕРАТ

Инфекционная бурсальная болезнь и инфекционная анемия цыплят являются значимыми и актуальными проблемами современной отрасли птицеводства. Вирус инфекционной бурсальной болезни (ИББ) и вирус инфекционной анемии цыплят (ИАЦ) имеют широкое распространение, вызывают серьезные поражения лимфоидных органов и тканей, в результате которых развиваются тяжёлые иммунодепрессивные состояния приводящие к повышению восприимчивости птиц к другим инфекциям, падению продуктивных показателей, снижению эффективности профилактических мероприятий и росту экономических затрат. Данные болезни в настоящее время в основном протекают в субклинической форме, по вакцинальному фону, в ассоциации, сопровождаются возникновением вторичных инфекций, отсутствием характерных клинических признаков, что затрудняет проведение диагностических исследований. Мы разработали мультиплекс ПЦР-анализ в реальном времени, который позволяет одновременно детектировать оба вируса в одной пробе. Данный ПЦР-анализ основан на праймерах, которые предназначены для выявления высоко консервативных перекрывающихся областей геномов вирусов ИББ и ИАЦ, и TaqMan-зондов в качестве системы детекции. Тесты на аналитическую чувствительность при 10-кратных серийных разведениях, показали, что анализ имеет высокий коэффициент детерминации

и эффективности. Анализ обладает специфичностью, отсутствием перекрёстной реактивности и неспецифической амплификации. Коэффициенты детерминации, эффективность реакции, низкая внутри- и межсерийная вариабельность сопоставимы с одиночными анализами на вирусы ИББ и ИАЦ. Мультиплексный формат позволяет существенно сократить время анализа, снизить риски возникновения контаминации, сохранив высокую чувствительность и специфичность реакции. Ожидается, что предложенный формат ПЦР-анализа обеспечит эффективность быстро идентифицировать вирусы ИББ и ИАЦ, что значительно повысит эффективность диагностических исследований.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Инфекционная бурсальная болезнь и инфекционная анемия цыплят являются значимыми и актуальными проблемами современной отрасли птицеводства. Обладая выраженным тропизмом к лимфоидным органам и тканям, эти вирусы нарушают функционирование иммунной системы птиц, в результате чего развивается иммуносупрессия, снижаются показатели продуктивности, увеличивается отход молодняка и, как следствие, значительно увеличиваются совокупные экономические затраты [1]. В результате поражения иммунной системы увеличивается восприимчивость птицы к вторичным инфекциям и снижается эффективность специфической профилактики [2].

Этиологическим агентом инфекционной бурсальной болезни является *Avibirnavirus* из семейства *Birnaviridae*, геном вируса представлен двухцепочечной сегментированной РНК. Основными вирусными белками являются VP1, VP2 и VP3 [3]. VP2 это основной капсидный белок вируса ИББ, помимо формирования капсида, он участвует в процессе прикрепления вируса к клетке-хозяину, является носителем основных антигенных детерминант, а мутации в его гипервариабельных областях могут влиять на патогенность вируса. Функция VP3 заключается в связывании вирусной РНК для формирования нуклеокапсида и участия в репликации вируса посредством взаимодействия с РНК-зависимой РНК-полимеразой (VP1), а также в сборке вирусных частиц [4]. VP1 является РНК-зависимой РНК-полимеразой. Он обеспечивает репликацию вирусного генома. VP1 взаимодействуя с VP3 образуют репликативный комплекс обеспечивающий стабильность и защиту вирусного генома, репликацию

и транскрипцию вирусной РНК и сборку новых вирионов [5].

Инфекционную анемию цыплят – вызывает *Gyrovirus* семейства *Anelloviridae*. Его геном представлен одноцепочечной кольцевой ДНК. Основными вирусными белками являются VP1, VP2, VP3 [6]. VP1- структурный белок, отвечающий за формирование капсида, в своей структуре он содержит основные эпитопы для нейтрализации вирусной активности антителами организма-хозяина. Белок VP2 является конформационным белком. Выступая в роли шаперона, он отвечает за правильную укладку VP1 при сборке зрелых вирионов. В виду того, что VP2 обладает фосфатазной активностью двойной специфичности он участвует в процессе репликации вирусной ДНК [7]. Белок VP3 – апоптин, вызывает апоптоз лимфоидных клеток организма-хозяина. VP3 является ключевым фактором патогенеза ИАЦ, играет важную роль в репликации и распространении вируса [8].

Инфекционная анемия цыплят и инфекционная бурсальная болезнь имеют сходные патологоанатомические признаки, такие как наличие геморагий в мышцах и фабрициевой сумке, атрофия бурсы, наличие в бурсе экссудата. Для вируса ИББ и ИАЦ характерен тропизм к лимфоидным органам и тканям. На фоне поражения органов иммунной системы развивается иммуносупрессия, что приводит к возникновению вторичных инфекций. Болезни часто протекают в субклинической форме, с отсутствием характерных клинических признаков, в виде ассоциированной инфекции, что затрудняет диагностику [9, 10].

В настоящее время, наиболее эффективным методом диагностики этих болезней является метод ПЦР. Данный метод

подходит для диагностики болезней с неясной клинической картиной [11]. Обладая рядом очевидных преимуществ над классическими диагностическими методами, ПЦР в реальном времени позволяет разработать протокол проведения исследований для одновременного выявления генетического материала вирусов ИББ и ИАЦ в одной пробе [12].

В рамках данного исследования был разработан и валидирован протокол мультиплексной ПЦР в реальном времени для выявления геномов вирусов ИББ и ИАЦ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Основой для подбора праймеров ПЦР-анализа послужили данные о полных и частичных геномных последовательностях вирусов ИББ и ИАЦ, представленные в базе данных генетических последовательностей GenBank (NCBI). Используя полученные нуклеотидные последова-

тельности, было проведено множественное выравнивание последовательностей с использованием программного обеспечения MEGA 11. После анализа и выявления наиболее консервативных участков генома был осуществлён подбор праймеров для каждого вируса с использованием сервиса PrimerQuest Tool (IDT). Анализ полученных праймеров осуществлялся с использованием сервиса OligoAnalyse Tool (IDT) и программного обеспечения Gene Runner 6.5. После выбора наиболее перспективных пар праймеров их синтез был осуществлён компанией ООО «Бигль» (Санкт-Петербург). После апробирования синтезированных праймеров и исключения наименее пригодных праймеров для использования в последующем мультиплексном анализе использовались праймеры, структура которых приведена в таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры используемые в мультиплексной ПЦР-РВ

Название возбудителя	Последовательность праймеров	Размер ампликона, п.н.
ИАЦ	ACGCTAAGATCTGCAACTG	130
	TTACCCTGTA CT CGGAGG	
	HEX-CAAGCCTCC-ZEN-CTCGAAGAAGC-3IABkFQ	
ИББ	CMAGATCAAACCCAACAGATTGT	115
	CTCTGACCTGAGAGTGTGCTTCTC	
	FAM-ACGGAGCCT-ZEN-TCTGATGCCAACAACC-IBFQ	

В качестве контрольных образцов использовались штаммы 26P4 (ИАЦ), ВНИВИП (ИББ) и Lukert (ИББ), а также заведомо положительные образцы из патологического материала. Положительный результат анализа характеризовался экспоненциальной кинетикой реакции с последующим достижением плато.

Экстракцию ДНК и РНК осуществляли с использованием набора «РИБО-сорб» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Обратную транскрипцию РНК вируса ИББ проводили набором «РЕВЕРТА - L» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Рос-

сия).

Реакция ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводилась в конечном объеме 25 мкл. Реакционная смесь состояла из 5 мкл коммерческой смеси 5X qPCRmix-HS (ЗАО Евроген, Россия), 0,5 мкл прямого и 0,5 мкл обратного праймеров (концентрация каждого 10 пмоль), 0,25 мкл зонда (концентрация 10 пмоль), 10 мкл исследуемого образца и 8,75 воды, не содержащей нуклеаз. При постановке реакции в обязательном порядке использовались отрицательные контрольные образцы. Состав реакционной смеси для контрольных образцов был идентичен

составу исследуемых проб, но не содержал ДНК-матрицы. Амплификацию ДНК проводили с использованием термоциклов Locus Intero (Tianlong, Китай) и CFX 96 (Bio-Rad, США) с использованием следующего режима: 1) предварительная денатурация – 95°C - 5 минут – 1 цикл; 2) денатурация – 95°C - 10 секунд, отжиг – 60°C - 30 секунд, элонгация – 72°C - 20 секунд – 39 циклов. Детекцию флуоресцентного сигнала осуществляли на этапе отжига. Учёт результатов осуществлялся на основании анализа кривых амплификации флуоресцентного сигнала по каналу FAM для ИББ и HEX для ИАЦ.

Специфичность мультиплексной ПЦР в режиме реального времени (мПЦР-РВ) определялась путём оценки способности разработанного анализа выявлять целевые последовательности вирусов ИББ и ИАЦ, отсутствию перекрестной реактивности и неспецифической амплификации. Для определения аналитической чувствительности использовали 10-кратные серийные разведения кДНК, охватывающие диапазон от 10^{-1} до 10^{-8} .

Воспроизводимость результатов оценивали по коэффициенту вариации (CV) в пределах одного аналитического цикла и между циклами, используя три повтора для каждого разведения.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

В результате анализа геномных последовательностей в качестве целевой мишени для подбора праймеров была выбрана перекрывающаяся область VP5/VP2 сегмента А генома вируса ИББ, и консервативная область VP2/VP3 генома вируса ИАЦ.

Для каждого из указанных консервативных участков геномов обоих вирусов был подобран ряд праймеров. Используя алгоритм Blast (NCBI), был проведен анализ подобранных праймеров для исключения пар с нежелательной гомологией в отношении нецелевых последовательностей. Система детекции была основана на использовании TaqMan-зондов с флуоресцентными метками FAM (6-карбоксихлорофлуоресцеин) для ИББ и гексахлорофлуоресцеином (HEX) для ИАЦ. В

результате исследований с гетеро- и гомогенными пробами было подтверждено, что выбранные пары праймеров (таблица 1) являются специфичными в отношении целевых мишеней и отсутствует неспецифическая амплификация (рисунок 1).

Несмотря на ряд успешно проведенных анализов, параметры проведения реакции с использованием данных праймеров требовали доработки и оптимизации. Для определения оптимальной концентрации праймеров используемых в реакции были проведены серии анализов с использованием различного объема каждого праймера (от 0,5 мкл до 2,0 мкл). Исходя из данных приведенных в таблице 2 следует, что средний наименьший пороговый цикл для обоих наборов праймеров достигался при использовании 1 мкл каждого праймера с концентрацией 10 пмоль/мкл.

Так как объём используемых в анализе TaqMan-зондов может значительно влиять на получаемые результаты (форма графиков амплификации, уровень флуоресценции и шумов, эффективность амплификации) следующим важным этапом необходимо было определить оптимальную концентрацию зондов. При проведении исследований с использованием различных концентраций зондов (от 0,25 мкл до 2,0 мкл), с каждым последующим увеличением объема используемых зондов, наблюдалось уменьшение интенсивности роста кривой амплификации в экспоненциальной фазе. Учитывая результаты приведенные в таблице 3, использование 0,25 мкл зонда являлось наиболее оптимальным.

Поскольку температура отжига праймеров является критическим параметром для эффективной и специфичной амплификации, следующим этапом нашей работы была её оптимизация. В отличие от этапов денатурации и элонгации, которые проводятся в стандартных температурных диапазонах (90-95 °C и 68-72 °C соответственно), температура отжига требует индивидуального подбора для каждой новой пары праймеров. Результаты исследований представлены в таблице 4.

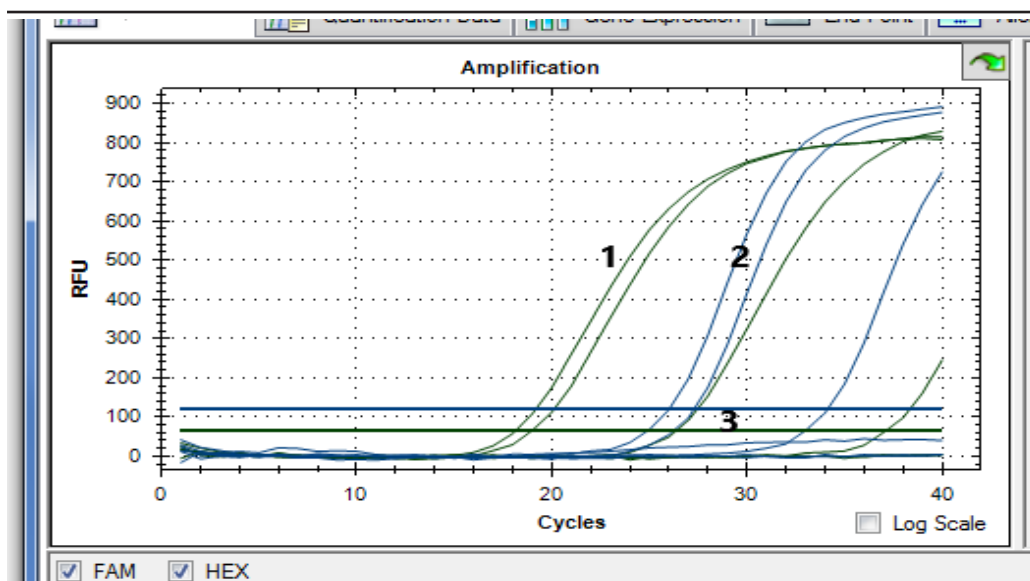


Рисунок 1 – График амплификации целевого фрагмента генома вируса ИББ и ИАЦ: 1 - образцы проб, содержащие геном вируса ИАЦ; 2 - образцы проб, содержащие геном вируса ИББ; 3 - образцы отрицательного контроля и проб, не содержащих геном ИББ и ИАЦ.

Таблица 2 – Значения порогового цикла при подборе оптимальной концентрации праймеров в мПЦР-РВ для ИББ и ИАЦ

Объем праймеров в мкл (концентрация 10 пмоль/мкл)	Среднее значение Ct	
	ИББ	ИАЦ
0,25	22,00	21,60
0,5	21,13	19,51
1,0	20,07	18,12
1,5	23,48	24,35
2,0	26,80	30,54

Таблица 3 – Значения порогового цикла при подборе оптимальной концентрации флуоресцентного зонда в мПЦР-РВ для ИББ и ИАЦ

Объем зонда в мкл (концентрация 10 пмоль/мкл)	Среднее значение Ct	
	ИББ	ИАЦ
0,25	20,03	18,42
0,5	21,28	19,91
0,75	22,75	21,40
1,0	30,98	25,29
1,5	32,98	25,54
2,0	36,44	26,05

Таблица 4 – Значения порогового цикла (Ct) при подборе оптимальной температуры отжига праймеров и зонда

Температура отжига		Среднее значение Ct	
		ИББ	ИАЦ
50 °C	15 сек	37,4	35,1
	20 сек	36,2	34,8
	30 сек	32,6	31,5
55 °C	15 сек	35,9	30,2
	20 сек	33,2	32,7
	30 сек	30,1	29,6
56 °C	15 сек	34,8	26,7
	20 сек	28,4	25,4
	30 сек	26,5	23,02
57 °C	15 сек	33,8	25,1
	20 сек	29,3	26,4
	30 сек	28,1	22,6
58 °C	15 сек	32,6	26,8
	20 сек	29,1	25,4
	30 сек	28,03	24,03
59 °C	15 сек	30,2	22,1
	20 сек	27,8	20,2
	30 сек	26,3	20,01
60 °C	15 сек	27,1	21,6
	20 сек	25,7	20,3
	30 сек	24,8	18,19

Полученные в ходе экспериментов данные, представленные в таблице 4, указывают на то, что наиболее оптимальной температурой отжига праймеров является температура 60⁰C.

Чувствительность является одним из наиболее значимых критериев оценки ПЦР-РВ. Для определения чувствительности разработанного анализа были подготовлены серийные десятикратные разведения выделенной суммарной РНК и ДНК целевых вирусов. С целью повышения статистической значимости результатов, каждое разведение было проанализировано в трёх повторностях. По полученным результатам установлено, что данный протокол позволяет обнаружить геном ИАЦ вплоть до разведения 10⁻⁷, а геном ИББ – до разведения 10⁻⁵.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Цель настоящего исследования состояла в разработке протокола мультиплекс ПЦР-РВ, для выявления генетического материала вирусов ИББ и ИАЦ.

В рамках разработки протокола, на основе анализа большого числа последовательностей, представленных в GenBank, были определены целевые, частично перекрывающиеся области геномов ИББ (VP5/VP2) и ИАЦ (VP2/VP3). Этот выбор обусловлен низкой вариабельностью и высокой степенью консервативности этих областей, а также позволяет охватывать большое количество вариаций данных вирусов с учетом мутационной изменчивости.

Для одновременной идентификации вируса ИББ и ИАЦ был разработан мПЦР

-анализ, основанный на использовании зондов, меченных различными флуорофорами. Аналитическая валидация протокола мПЦР включала оценку специфичности, чувствительности и воспроизводимости. Анализ продемонстрировал высокую специфичность, характеризующуюся отсутствием перекрёстной реактивности и неспецифической амплификации.

Несмотря на то, что для постановки ПЦР требуется дополнительно провести реакцию обратной транскрипции (ОТ) для РНК вируса ИББ, это не оказывает негативного влияния на ДНК вируса ИАЦ и, соответственно, на итоговые результаты ПЦР-анализа.

Разработанный протокол мультиплекс ПЦР-РВ позволяет быстро и точно выявлять геном вируса ИББ и ИАЦ в исследуемых образцах, что важно для своевременной постановки диагноза и проведения профилактических и противоэпизоотических мероприятий.

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX REAL-TIME PCR ANALYSIS FOR THE DETECTION OF INFECTIOUS BURSA VIRUS AND INFECTIOUS CHICKEN ANAEMIA VIRUS

Semina A.N. * – Candidate of Veterinary Sciences, Leading Researcher Researcher Department of Molecular Biology Research (ORCID 0000-0001-7641-9105); **Dmitriev K.Y.** – Candidate of Veterinary Sciences, Senior Researcher at the Department of Molecular Biology Research

All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science – branch of the Federal Scientific Center «All-Russian Research and Technological Institute of Poultry»

* anna14.05@mail.ru

Financing: *The work was carried out as part of the state assignment of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation (theme No. 1022041100550-5-4.3.1).*

ABSTRACT

Infectious bursal disease and infectious anemia of chickens are significant and pressing problems in the modern poultry indus-

try. The infectious bursal disease virus (IBDV) and chicken infectious anemia virus (CIAV) are highly prevalent, causing severe damage to lymphoid organs and tissues. This results in significant immunosuppression, increasing poultry susceptibility to secondary infections, reducing production performance, diminishing the efficacy of preventive measures, and raising economic losses. Currently, these diseases primarily occur in subclinical forms, against a vaccine-induced immunity background, and in co-infections. They are often accompanied by secondary infections and lack distinctive clinical signs, complicating diagnosis. We developed a multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of both viruses in a single sample. The assay employs primers targeting highly conserved overlapping regions of the IBDV and CIAV genomes, with TaqMan probes for detection. Analytical sensitivity testing using 10-fold serial dilutions confirmed high coefficients of determination and amplification efficiency. The assay demonstrates high specificity, with no cross-reactivity or nonspecific amplification. Its performance metrics (determination coefficients, reaction efficiency, and low intra- and inter-assay variability) are comparable to single-assays for IBDV and CIAV. The multiplex format significantly reduces processing time, minimizes contamination risks, and maintains high sensitivity and specificity. This PCR assay is expected to enable rapid and accurate identification of IBDV and CIAV, greatly improving diagnostic efficiency.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. J. Hoerr. Clinical aspects of immunosuppression in poultry. *Avian Dis.* 54 (2010): 2–15. URL: <https://doi.org/10.1637/8909-043009-Review.1>.
2. Gimeno IM, Schat KA. Virus-Induced Immunosuppression in Chickens. *Avian Dis.* 2018 Sep;62(3):272-285. doi:10.1637/11841-041318-Review.1. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30339511/>.
3. M. E. Dmitrieva, A. S. Dubovoi, V. A. Manuvera [et al.]. Biological properties of infectious bursal disease virus. *Research*

- Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2018. Vol. 9, No. 6: 1891-1896. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=38674853>.
4. Shirokov D. A., Manuvera V. A., Lazarev V. N. [et al.]. Complete genome sequence of a novel very virulent strain of infectious bursal disease virus circulating in Russia. *Microbiology Resource Announcements*. 2018. Vol. 7, No.20: e01084-18. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=38618595>.
5. Shirokov D. A., Manuvera V. A., Lazarev V. N. [et al.]. Generation of recombinant VP3 protein of infectious bursal disease virus in three different expression systems, antigenic analysis of the obtained polypeptides and development of an ELISA test. *Archives of Virology*. 2020. Vol. 165, No. 7: 1611-1620. - DOI 10.1128/MRA.01084-18. Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=43274990>.
6. Lin W, Zhang Z, Xu Z. et al. The association of receptor of activated protein kinase C 1(RACK1) with infectious bursal disease virus viral protein VP5 and voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) inhibits apoptosis and enhances viral replication. *J Biol Chem*. 2015. Mar 27; 290 (13): 8500-10. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820639904?via%3Dihub>.
7. Rosario, M. Breitbart, B. Harrach, J. Segalés, E. Delwart, P. Biagini, A. Varsani. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Arch. Virol*. 162 (2017): 1447–1463. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-017-3247-y>.
8. Claudia Techera, Ana Marandino, Gonzalo Tomás, Sofia Grecco, Martín Hernández, Diego Hernández, Yanina Panzera & Ruben Pérez. Origin, spreading and genetic variability of chicken anaemia virus. *Avian Pathology*. 2021. T.50:4: 311-320. URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03079457.2021.1919289>.
9. Lai GH, Lin MK, Lien YY, Cheng JH, Sun FC, Lee MS, Chen HJ, Lee MS. Characterization of the DNA binding activity of structural protein VP1 from chicken anaemia virus. *BMC Vet Res*. 2018. May 4. - T. 14 (1): 155. URL: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-018-1465-5>.
10. E. Eregae, C. E. Dewey, S. A. McEwen, R. Ouckama, D. Ojkić, M. T. Guerin. Flock prevalence of exposure to avian adeno-associated virus, chicken anemia virus, fowl adenovirus, and infectious bursal disease virus among Ontario broiler chicken flocks. *Avian Dis*. 2014 (58): 71–77. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24758116/>.
11. Абгарян, С. Р. Молекулярно-биологические методы диагностики болезней птиц / С. Р. Абгарян // Актуальные вопросы ветеринарной медицины и лабораторной диагностики : материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора В.В. Рудакова, Санкт-Петербург, 25–26 мая 2023 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2023. – С. 3-5. – Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=54023930>.
12. Marandino, G. Tomás, M. Hernández, Y. Panzera, M.I. Craig, A. Vagnozzi, F. Vera, C. Techera, S. Grecco, A. Banda, D. Hernández, R. Pérez. Development of RT-qPCR assays for the specific identification of two major genotypes of avian infectious bronchitis virus. *J. Virol. Methods*. 2016. 235: 21–25. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093416300325?via%3Dihub>.

REFERENCES

1. J. Hoerr. Clinical aspects of immunosuppression in poultry. *Avian Dis*. 54 (2010): 2–15. URL: <https://doi.org/10.1637/8909-043009-Review.1>.
2. Gimeno IM, Schat KA. Virus-Induced Immunosuppression in Chickens. *Avian Dis*. 2018 Sep;62(3):272-285. doi:10.1637/11841-041318-Review.1. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30339511/>.
3. M. E. Dmitrieva, A. S. Dubovoi, V. A. Manuvera [et al.]. Biological properties of infectious bursal disease virus. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and*

- Chemical Sciences. 2018. Vol. 9, No. 6: 1891-1896. Access mode: <https://elibrary.ru/item.asp?id=38674853>.
4. Shirokov D. A., Manuvera V. A., Lazarev V. N. [et al.]. Complete genome sequence of a novel very virulent strain of infectious bursal disease virus circulating in Russia. *Microbiology Resource Announcements*. 2018. Vol. 7, No.20: e01084-18. Access mode: <https://elibrary.ru/item.asp?id=38618595>.
5. Shirokov D. A., Manuvera V. A., Lazarev V. N. [et al.]. Generation of recombinant VP3 protein of infectious bursal disease virus in three different expression systems, antigenic analysis of the obtained polypeptides and development of an ELISA test. *Archives of Virology*. 2020. Vol. 165, No. 7: 1611-1620. - DOI 10.1128/MRA.01084-18. Access mode: <https://elibrary.ru/item.asp?id=43274990>.
6. Lin W, Zhang Z, Xu Z. et al. The association of receptor of activated protein kinase C 1 (RACK1) with infectious bursal disease virus viral protein VP5 and voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) inhibits apoptosis and enhances viral replication. *J Biol Chem*. 2015. Mar 27; 290 (13): 8500-10. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820639904?via%3Dihub>.
7. Rosario, M. Breitbart, B. Harrach, J. Segalés, E. Delwart, P. Biagini, A. Varsani. Revisiting the taxonomy of the family *Circoviridae*: establishment of the genus *Cyclovirus* and removal of the genus *Gyrovirus*. *Arch. Virol.* 162 (2017): 1447–1463. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-017-3247-y>.
8. Claudia Techera, Ana Marandino, Gonzalo Tomás, Sofia Grecco, Martín Hernández, Diego Hernández, Yanina Panzera & Ruben Pérez. Origin, spreading and genetic variability of chicken anemia virus. *Avian Pathology*. 2021. T.50:4: 311-320. URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03079457.2021.1919289>.
9. Lai GH, Lin MK, Lien YY, Cheng JH, Sun FC, Lee MS, Chen HJ, Lee MS. Characterization of the DNA binding activity of structural protein VP1 from chicken anemia virus. *BMC Vet Res*. 2018. May 4. - T. 14 (1): 155. URL: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-018-1465-5>.
10. E. Eregae, C. E. Dewey, S. A. McEwen, R. Ouckama, D. Ojkić, M. T. Guerin. Flock prevalence of exposure to avian adenovirus, chicken anemia virus, fowl adenovirus, and infectious bursal disease virus among Ontario broiler chicken flocks. *Avian Dis*. 2014 (58): 71–77. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24758116/>.
11. Abgaryan, S. R. Molecular biological methods for diagnosing bird diseases / S. R. Abgaryan // Current issues of veterinary medicine and laboratory diagnostics: Proceedings of the international scientific and practical conference dedicated to the 100th anniversary of the birth of Professor V.V. Rudakov, St. Petersburg, May 25–26, 2023. – St. Petersburg: St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, 2023. – Pp. 3–5. – Access mode: <https://elibrary.ru/item.asp?id=54023930>.
12. Marandino, G. Tomás, M. Hernández, Y. Panzera, M.I. Craig, A. Vagnozzi, F. Vera, C. Techera, S. Grecco, A. Banda, D. Hernández, R. Pérez. Development of RT-qPCR assays for the specific identification of two major genotypes of avian infectious bronchitis virus. *J. Virol. Methods*. 2016. 235: 21–25. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093416300325?via%3Dihub>.