

РАСПРОСТРАНЕНИЕ МЕТАПНЕВМОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В УКРАИНЕ И ЕЕ СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

О. В. ИВЛЕВА

Луганский национальный аграрный университет,
г. Харьков, Украина, 61000

(Поступила в редакцию 02.02.2019)

Изучено распространение метапневмовирусной инфекции среди индеек и кур в приусадебных хозяйствах Харьковской области. С помощью ИФА положительно реагирующих индеек выявлено 78,0 %, кур – 100 %. В Луганском НАУ разработана ИФА тест-система для диагностики МПВИ индеек и кур в одном разведении сыворотки.

Ключевые слова: эпизоотология, мониторинг, заболевание, индейки, куры, иммуноферментный анализ.

The distribution of metapneumovirus infection among turkeys and chickens in private farms of the Kharkiv region was studied. With the help of ELIA, positively reactive turkeys found 78.0 %, chickens – 100 %. In the Luhansk NAU, in ELIA test was developed for the diagnosis of MPVI of turkeys and chickens in one serum dilution.

Key words: epizootology, monitoring, disease, turkeys, chickens, ELISA.

Введение. Использование высокопродуктивных кроссов птицы, импортируемых в Украину, привело к распространению ранее неизвестных вирусных болезней, к которым относится метапневмовирусная инфекция (МПВИ), характеризующаяся поражением верхних дыхательных путей у индеек и кур.

В литературе заболевание описано под названием ринотрахеит (Turkey Rhino Tracheitis – TRT) – воспаление носовых пазух, синусов и трахеи у индеек; «синдром пухлой головы» (SHS – Swollen head syndrome) – у бройлеров и кур. Причиной заболевания является пневмовирус, который относится к роду *Metapneumovirus*, подроду *Paramyxovirinae*, семейству *Paramyxoviridae* [1].

Впервые респираторное заболевание у индеек было зарегистрировано в 1978 году в Южной Африке. Ученые Morley и Thomson считали, что его причиной является смешанная инфекция, вызванная короновирусом и кишечной палочкой. В 1985 году подобное заболевание у индеек было зарегистрировано в Англии (Norfolk), которое быстро распространилось в другие страны Европы. В США TRT регистрировали у индеек в штатах Колорадо и Миннесота [1]. На сегодняшний день TRT-инфекция встречается во всех странах мира с развитым птицеводством (Израиль, США, Канада, Англия, Северная Ирландия, Бразилия, Марокко, Россия) [5].

Метапневмовирусная инфекция способна в короткие сроки охватить до 100 % восприимчивого поголовья в птичнике, однако уровень смертности не превышает 2–5 %. В бройлерных стадах – от 1 до 10 % [1, 2, 5]. Тяжесть клинических признаков заболевания зависит от санитарных условий содержания и от наличия возбудителей бактериальных и других вирусных инфекций. Проявляется опуханием головы и шеи с характерными респираторными признаками и снижением яйценоскости.

При патологоанатомическом вскрытии часто обнаруживают отек соединительной ткани головы, серозно-гнойные воспаления носовых путей и синусов, а также хронические энтериты, аэросаккулиты, перитонит и воспаление яичников. Встречается выпотевание фибрина или крови в подкожную клетчатку, которая придает голове синевато-зеленый цвет (гемосидероз).

Вирус передается воздушно-капельным и контактным путями [2].

При осложнении секундарной микрофлорой характерными являются конъюнктивиты с белым экссудатом, диарея с экскрементами зеленого цвета. Течение инфекционных заболеваний в ассоциированной и латентной формах затрудняет проведение диагностических и профилактических мероприятий. Инфекционные болезни, связанные с поражением респираторного тракта, заслуживают особого внимания. Если диагностика ИЛТ, НХ, ГП не представляет труда, то диагностировать МПВИ довольно трудно. Это связано с разнообразием и особенностями штаммов вируса, а также ассоциированное течение с другими вирусными инфекциями и часто осложняется секундарной (вторичной) бактериальной инфекцией, такой как: колибактериоз, респираторный микоплазмоз, орнитобактериоз. Затрудняют оценку клинической картины и патологоанатомические признаки микотоксикозов (поражение печени, почек), широкое использование антибиотиков (отсутствие опухания синусов и головы), течение болезни на вакцинном фоне и в ассоциации.

Диагноз на МПВ-инфекцию птицы устанавливают на основе лабораторных исследований с учетом эпизоотологических данных, клинических признаков, серологической диагностики и патологоанатомических изменений. Антитела на пневмовирус птицы можно определить с помощью РН вирусов в культурах органов или в культурах клеток фибробластов куриных эмбрионов. Для выявления антител также используют методы непрямой иммунофлюоресценции и реакции иммунодиффузии.

Во многих странах мира для диагностики TRT-инфекции используют различные реакции: РНИФ, РН, ИФА и метод иммуноцитохимии. С их помощью можно установить эпизоотологический диагноз на

TRT-инфекцию, но оценить напряженность иммунитета после прививки птицы невозможно [2–4, 5, 11].

В связи с отсутствием в нашей стране диагностических препаратов исследования по распространению TRT-инфекции в птицеводческих хозяйствах Украины различных форм собственности не проводились.

Сейчас на вооружении научно-исследовательских и производственных ветеринарных лабораторий в Украине отсутствуют стандартные отечественные диагностические наборы для экспресс-диагностики МПВ-инфекции кур и индеек, а зарубежные аналоги имеют очень высокую цену (30 000 гривен) и не доступны для широкого круга ветеринарных лабораторий. Поэтому на сегодняшний день необходимы более доступные и чувствительные серологические реакции, которые можно было бы использовать в практике ветеринарной медицины Украины для контроля данного заболевания. Такой тест-системой на современном этапе является ИФА, в чем и заключается актуальность данной работы.

Целью исследований было провести эпизоотологическое обследование птицеводческих хозяйств разных форм собственности в Харьковской области в отношении МПВИ и разработать отечественную ИФА-тест-систему для контроля данного заболевания в сравнении с ИФА-методом зарубежного производства.

Материал и методика исследований. За период 2016–2018 гг. в приусадебных хозяйствах восточных регионов Украины проводили обследование по инфекционным заболеваниям среди индеек, кур и гусей с использованием эпизоотологических, вирусологических и серологических методов исследований.

При проведении эпизоотологического обследования особое внимание уделяли клиническому проявлению заболевания, патологоанатомическим изменениям, течению болезни, возрасту больной птицы, источнику инфекции и экономическим убыткам от нее. Распространение инфекции изучали с помощью серологических исследований в ИФА среди индеек кросса «Биг-6» и «Бют-8» в возрасте 160 и 480 дней, завезенных в хозяйства из Германии и Венгрии, кур родительского стада в возрасте 250 дней и гусей местных пород возрастом 170 дней.

Для бактериологических исследований были использованы выделенные от погибших индеек, гусей и их молодняка изоляты микроорганизмов; типоспецифические колибактериозные и сальмонеллезные сыворотки, глюкоза, сыворотка лошадей; питательные среды МПБ, МПА, Эндо, Висмут-Сульфитный агар.

Для проведения вирусологических исследований – суспензию патологического материала, куриные 9-суточные, перепелиные 6-суточные и гусиные 12-суточные эмбрионы (коммерческие эмбрионы,

свободные от патогенной микрофлоры и специфических антител к метапневмо- и реовирусу), полевые изоляты вирусов, первичную культуру клеток куриных и гусиных эмбрионов (КК ФЭК, ФЕГ). Вирусологические и бактериологические исследования проводили по общепринятым методикам [6] в отделе обеспечения качества кормов и ветеринарного благополучия Государственной исследовательской станции птицеводства Национальной академии аграрных наук (ГИСП НААН). Для проведения вирусологических исследований патологический материал (головы и трахеи с легкими от клинически больной или погибшей птицы) хранили при температуре минус 20 °С. Серологические исследования проводили в Национальном научном центре «Института экспериментальной и клинической ветеринарии (ННЦ «ИЭКВМ») и ГИСП НААН с помощью ELISA («IDEXX», США) и РНГА (эритроцитарный диагностикум, разработанный в Институте птицеводства НААН – ныне ГИСП).

Накопление метапневмовируса для ИФА-метода осуществляли путем его репродукции на первично-трипсинизированной культуре клеток куриных эмбрионов (ФЭК), свободных от специфических антител.

Для ИФА-метода наработанный антиген очищали и концентрировали по схеме, которая включала предварительную очистку вируса, его концентрирование и завершающую очистку. Ультраструктуру вируса изучали с помощью электронного микроскопа ПЭМ-125К при ускоряющем напряжении 75 kV, имеющем в своем составе систему съемки и анализа изображения САИ – 01А (АО «SELMi», г. Сумы, Украина) на основе CCD камеры DX– 2 и программ фирмы «КАРРА», Германия.

Диагностические сыворотки крови (положительную) получали путем гипериммунизации 30-дневных цыплят и индюшат, свободных от антител к возбудителям НБ, ИББ, ИБК, и МПВИ, путем трехкратного введения очищенного и концентрированного МПВ-антигена (МАГ) по следующей схеме: двукратное введение МАГ в объеме 0,5 см³ с интервалом 14 дней после первой иммунизации; третья иммунизация – МАГ предварительно смешивали в соотношении 30:70 (1: 3) с адьювантом «Монтанид» ISA-70 и через 14 дней после второй иммунизации вводили внутримышечно в объеме 1,5 см³ [9]. Нормальную сыворотку получали от интактных цыплят в возрасте 90 дней методом тотального обескровливания. Диагностические сыворотки хранили при температуре минус 20 °С или их лиофилизировали.

Для исследований использовали коммерческий конъюгат, реактивы отечественного и импортного производства. Сенсибилизацию планшетов, внесение исследуемых сывороток на планшеты, определение рабочих разведений МПВ-антигена проводили по методике, разработан-

ной в ФДБУ «ВНИИЖТ», Владимир (2008) и ГИСП НААН (2012) [7–9].

Диагностическую ценность ИФА тест-системы устанавливали в сравнении с ИФА-тест-системой фирмы «IDEXX» (США).

Производственную проверку проводили на базе «Экспериментальной фермы сохранения государственного генофонда птицы» ГИСП НААН и в отделе обеспечения качества кормов и ветеринарного благополучия. На ферме было привито 5315 голов цыплят в возрасте 7 дн и 574 головы индюшат в возрасте 10 дн живой лиофилизированной вакциной против МПВ-инфекции птиц: пневмовирусного ринотрахеита индеек, синдрома опухшей головы кур, производства ХИПРАВИАР SHS (Испания), зарегистрированной в Украине за № ВА-00559-02-13 от 18.12.2017 г.

Результаты исследований и их обсуждение. В 2016–2018 гг. в приусадебных птицеводческих хозяйствах Харьковской области был проведен клинический осмотр индеек породы «Белая широкогрудая» возрастом 60–70 дней отечественной популяции, кросса «Биг-6», «Биг-8» и «Бют-8» в возрасте от 1 до 480 дней, завезенных из Германии и Венгрии, цыплят кросса «Хайсекс белый» возрастом 6 дней, завезенных из Польши, кур-несушек кросса «Хайсекс коричневый» (250 дней), кур родительского стада (250 дней) и гусей местных пород (180 дней).

За два года в этих же хозяйствах наблюдалась гибель цыплят (до 1 %), индюшат (до 2 %) и гусят 5-суточного возраста (1,8 %), полученных от родителей положительно реагирующих на метапневмо- и реовирусную инфекции (МПВИ, РВИ). При вскрытии погибшей птицы установлены периорбитальные синуситы, накопление фибрина на конъюнктиве и слизистой трахеи, перигепатит, перикардит, кровенаполнение и дряблость селезенки и почек, двустороннюю пневмонию с наличием фибрина, геморрагический энтерит. Для вирусологических исследований отбирали легкие, трахею, печень (рис.1, 2).



Рис. 1. Геморрагическое воспаление слизистой трахеи с наличием фибрина



Рис. 2. Двухсторонняя пневмония с наличием фибрина

Бактериологическими исследованиями из крови легких и сердца птицы изолировали патогенные серотипы *E.coli* (сер. O115, O78), *Staphylococcus spp.* та *Streptococcus spp.* (1–3,0 %), *Pseudomonas aeruginosa* (1,0 %), *Mycoplasma spp* (0,05 %). Установлено, что *E. coli* и

кокковая микрофлора были малочувствительными или не чувствительными к гентамицину, энрофлоксацину, ципрофлоксацину, фторфениколу (13–16 мм), а *Pseudomonas aeruginosa*, – малочувствительной к гентамицину, фторфениколу (18 мм), но чувствительной к хлорамфениколу (20 мм).

В 2016–2017 гг. при исследовании сывороток крови (206 проб) выявлено положительно реагирующих на МПВИ индеек, в среднем, 78 %, с титрами антител (ТА) от 740 до 27869 (ИФА «IDEXX»), 1: 8 – 1: 512 (РНГА). Среди кур – 100 % и 0 %.

В 2018 г. среди кур были обнаружены положительно реагирующие на МПВИ с ТА 1517 до 51272 (ИФА). Среди индеек и гусей – на МПВИ и АРВИ с ТА от 1: 8 (3 lg) до 1: 128 (7 lg) (РНГА).

Параллельно за период 2016–2018 гг. среди положительно реагирующих на МПВИ индеек было выявлено 60–80 % птицы с ТА 11051–21769 положительно реагирующей на микоплазмоз.

Поскольку в течение 3-х лет в хозяйствах вакцинопрофилактика против МПВИ, АРВИ и микоплазмоза не проводилась, полученные результаты серологического мониторинга указывали на циркуляцию эпизоотических штаммов данных инфекций и их стационарность.

Для индикации изолятов, выделенных от больных цыплят, гусят и индюшат, были использованы печень, легкие, сердце, почки и экстра-эмбриональная жидкость инфицированных эмбрионов. С помощью ПЦР обнаружены РНК-геномы МПВ и АРВ.

При изоляции МПВ использовали 10-дневные куриные эмбрионы, а для его накопления – первично-трипсинизированную КК ФЭК, где патогенное действие вируса проявлялось в округлении клеток, их отслоении и образовании синцития. Нарушение 80–90 % клеточного монослоя наблюдали на 4–5 сутки после заражения. Инфекционный титр вируса, которому дали название PVCh-16, составил 2,8 lg ТЦД₅₀/см³.

Изоляцию реовируса от индюшат и гусят осуществляли на 9-суточных эмбрионах кур и 12-дневных эмбрионах гусей, проведением 3-х пассажей. При вскрытии инфицированных эмбрионов были обнаружены патогномичны для реовирусной инфекции изменения (увеличение и кровенаполнение печени с желтым цветом ее правой доли, точечные кровоизлияния на мышцах груди).

Идентификацию изолированных вирусов осуществляли в РН с использованием положительной и отрицательной сывороток крови, входящих в ИФА-наборы (IDEXX) для диагностики МПВИ и АРВИ. Установлено, что выделенный от цыплят изолят PVCh-16, положительно реагировал в разведении 1: 80 с положительной сывороткой к штамму BUT1-8544 метапневмовируса и 1:320 с гиперимунной сывороткой к штамму PVT-09/ подтипу В метапневмовируса. А изоляты, выделенные от больных индюшат и гусят, положительно реагировали (1:128,

1:256) с положительной сывороткой к штамму 1133 реовируса, что свидетельствует об их отношении к семейству *Reoviridae*.

Таблица 1. Идентификация вирусов, изолированных от больной птицы в РН

Использованные сыворотки к:	Титры к изолятам от:		
	индюшат (АРВ)	гусят (АРВ)	цыплят штамм PVCh- 16 (МПВ)
Гипериммунная (шт. PVT-09/В МПВ)	–		1:320
шт. BUT1-8544 МПВ, вакцинный	–		1:80
шт. 1133 АРВ, вакцинный	1:256	1:128	–
нормальная (отрицательная)	0	0	0

Таким образом, полученные результаты эпизоотологического обследования приусадебных хозяйств свидетельствуют о том, что среди индеек, кур и гусей в ассоциации циркулировали возбудители двух инфекций (МПВ, АРВ) на фоне секундарной микрофлоры, что подтверждено серологическими, бактериологическими и вирусологическими исследованиями (их изоляция от больной птицы) и индикацией геномов МПВ и АРВ методом ПЦР.

Если на данном этапе для диагностики АРВИ кур разработана отечественная ИФА-тест-система (Институт птицеводства НААН 2012 г.) [9], то диагностика МПВИ требует ее создания на современном уровне с целью повышения эффективности эпизоотологического мониторинга при изучении распространения болезни и контроля иммунного статуса у привитой птицы, что и является актуальностью для отечественной практики ветеринарной медицины.

Перспективы дальнейших исследований заключались в разработке отечественного диагностика, который не уступал бы импортной тест-системе, был специфичным, чувствительным и экономически выгодным методом для мониторинговых и скрининговых исследований в отношении МПВИ в птицеводческих хозяйствах Украины. Такой тест-системой стал непрямой метод ИФА, который широко используется в вирусологических исследованиях наряду с другими диагностическими препаратами.

Основными этапами разработки такого метода было: изготовление специфических (антиген, контрольные сыворотки крови) и подбор неспецифических (буферные растворы, субстрат, конъюгат) компонентов и определение оптимальных условий проведения реакции.

С целью накопления вируса использовали фибробласты 10-суточных куриных эмбрионов, свободных от специфических антител к МПВ, а получение антигена – штамм PVT- 09/В метапневмовируса индеек, который ранее использовался в качестве антигена при разработке эритроцитарного диагностикума для РНГА [10, с.6]. Данный диагностикум вошел в «Инструкцию по профилактике и ликвидации

метапневмовирусной инфекции птицы» (Приказ Министерства аграрной политики и продовольствия Украины от 10 мая 2018 № 238).

В качестве инактиванта использовали этиленимин (ЭИ) производства института физической химии (г. Москва) или ООО НПП «Биохимресурс» (г. Владимир, РФ). При определении его концентрации установлено 100 % инаktivацию штамма при температуре 37 °С с экспозицией 24 часа в конечной концентрации ЭИ 0,1%. Полноту инаktivации определяли проведением 3-х последовательных «слепых» пассажей на культуре клеток 10-суточных КЭ, свободных от специфических антител.

Очистку и концентрирование полученного антигена осуществляли путем ультрацентрифугирования, что позволило повысить его инфекционный титр до $4,33 \pm 0,5 \lg \text{TCID}_{50} \text{ см}^3$. Степень очистки контролировали с помощью электронной микроскопии методом негативного контрастирования.

В дальнейшем антиген использовали для получения гипериммунной сыворотки к МПВ и для разработки ИФА тест-системы. Схема иммунизации птицы основывалась на введении каждые 14 дней в течение 2-х месяцев нарастающих доз очищенного метапневмовируса цыплятам и индюшатам в возрасте 30 дней (табл.2).

Таблица 2. Схема иммунизации цыплят очищенным штаммом МПВ

Иммунизация	Материал для иммунизации	Интервал между иммунизациями	Способ введения, доза
1	Очищенный штамм PVT-09/B МПВ	14 діб	внутримышечно 0,5 см ³
2	Очищенный штамм PVT-09/B МПВ		внутримышечно 0,5 см ³
3	Очищенный штамм PVT-09/B МПВ + Мон-танид ISA-70 (3:1)		внутримышечно 1,5 см ³

При гипериммунизации цыплят инаktivированным антигеном PVT-09/B МПВ, получены положительные сыворотки крови с ТА у цыплят 1:3200, индюшат 1:6400 (ИФА, IDEXX). Индукция специфических антител к МПВ при 3-х кратной иммунизации цыплят штаммами PVCh-16 и PVT-09/B МПВ достигала 1:1700 и 1:2800 соответственно (ИФА «IDEXX»). Специфичность очищенного и концентрированного антигена (АГ) МПВ проверяли в непрямом варианте ИФА с использованием различных положительных референтных сывороток крови кур. Согласно полученным результатам, положительные ТА (1: 6400) были получены только к МПВ. С другими гипериммунными сыворотками реакция была отрицательной (<1:100, 1:100). Диагностический титр в ИФА устанавливали методом последовательных разведений различных сывороток, начиная с разведения 1: 100 до 1: 12800. Для каждого

разведения сыворотки определяли коэффициент корреляции, со значением титров при последовательных их разведениях ($\lg T$ к $\lg S / P$) подсчитанных для каждой сыворотки в разведении 1: 400, которое было определено рабочим (рис. 3).

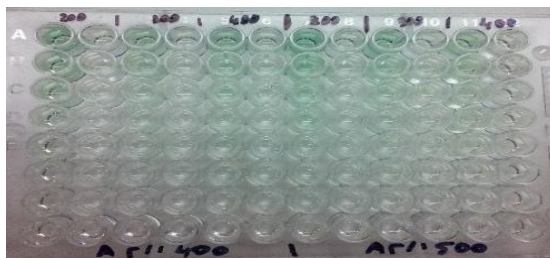


Рис. 3. Определение уровня антител с помощью тест-системы ИФА

В соответствии со значениями ОП исследуемых сывороток с помощью компьютерной программы Statistica (Correlation matrices) была построена калибровочная кривая и выведено уравнение линейной регрессии для расчета логарифмического значения титров исследуемых сывороток.

Определен ПНП (положительно-отрицательный порог): отрицательные сыворотки с титром от 0-850, положительные – от 850 и выше.

Воспроизводимость тест-системы определяли по проценту разбега от среднего значения ОП образцов одной сыворотки, которая для положительной составила 0,5–1,0 %, для отрицательной – 3,0–5,0 %, то есть в пределах нормы. Гипериммунные сыворотки в ИБК, ИББ, РЕО, НХ, ССЯ не имели титров при тестировании.

Оценку чувствительности и специфичности тест-системы проводили путем сравнительного анализа результатов тестирования сывороток в разрабатываемой тест-системе ИФА («LAU», Украина) с ИФА-тест-системой фирмы «IDEXX» (США). Параллельно сравнивали 60 сывороток крови индеек с разной активностью (30 сывороток от индеек, не привитых против МПВИ и 30 сывороток крови индеек, привитых против МПВИ). У не привитых против МПВИ индеек ТА к вирусу в ИФА колебались от 0 до 223 (разрабатываемая система ИФА «LAU») при ПНП 850, тогда как при использовании тест-системы фирмы «IDEXX» – от 0 до 302 при ПНП 396. У привитой птицы ТА в ИФА «LAU» были в пределах от 3352 до 8105, в ИФА «IDEXX» – от 2946 до 6044.

Установлено, что чувствительность и специфичность разработанной тест-системы в сравнении с коммерческой («IDEXX») составила 100 % и 97,4 % соответственно.

При проведении производственной проверки испытуемой тест-системы напряженность иммунитета к МПВИ у привитой птицы опре-

деляли ИФА-тест-системой, разработанной в Луганском НАУ, по сравнению с тест-системой фирмы «IDEXX». Для исследований было отобрано по 25 сывороток крови кур и индеек в возрасте 40 и 60 дней соответственно. При использовании отечественного ИФА-диагностикума у кур были обнаружены положительные ТА от 3492 до 5803 («LAU»), 2988 – 5675 («IDEXX»), у индеек – 1924 – 6786 («LAU») и 1051–6614 «IDEXX». Через 90 дней у привитых индеек они сохранялись в пределах 3352 – 11044 («LAU», Ukraine) по сравнению с тест-системой ИФА фирмы «IDEXX» 2946 - 8595; кур – 3045-14446 и 2100–10687 соответственно.

Таким образом, результаты проведенных нами исследований показали, что разработанный ИФА-метод является тем диагностическим тестом, который позволяет выявить инфицированных кур и индеек в хозяйстве, а также определить напряженность иммунитета против МПВ-инфекции у привитых, что и явилось основанием для разработки ТУ У и методических рекомендаций «Лабораторная диагностика и профилактика метапневмовирусной инфекции птицы при смешанных вирусно-бактериальных патогенах», «Диагностика метапневмовирусной инфекции птицы методом иммуноферментного анализа».

Заключение. В статье приведены теоретическое обобщение и новое решение научной задачи по решению проблемы контроля эпизоотической ситуации при ассоциированном течении МПВИ птицы и напряженности иммунитета после ее вакцинации против данного заболевания на основе разработки набора компонентов для диагностики МПВИ на основе метода иммуноферментного анализа (непрямого ИФА).

По сравнению с зарубежными аналогами («IDEXX» – (192 пробы) стоят 12.000 грн, то есть 1 проба = 62,5 грн) набор компонентов отечественной ИФА-тест-системы будет стоить 4,28 тыс. грн (одна тестируемая проба сыворотки крови – 22,3 грн.), это дешевле почти в 3 раза, и может быть доступной для специализированных лабораторий ветеринарной медицины. На основании полученных результатов она является конкурентоспособной и импортозамещающей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корелла, Х. С. Проблемы с метапневмовирусом в стадах кур-несушек / Х. С. Корелла, В. В. Сафаров // БИО. – 2013. – № 5. – С. 29–31.
2. Епізоотологічний моніторинг метапневмовірусної інфекції птиці в Україні / Стегній Б.Т. [та інші.] // Ветеринарна медицина. – 2012. – Випуск 96. – С. 240–243.
3. Ирза, А. В. Разработка тест-систем для оценки мукозального и клеточного иммунитета птиц: дис. канд. биол. наук:03.02.02 / А. В. Ирза. – Владимир, 2012. – 152 с.
4. Методические рекомендации по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных и птицы с использованием серологических реакций. Ч.1: методические рекомендации /ФГУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2008. – С. 59–60.

5. The use of an ELISA test to detect antibodies to turkey rinotracheestis / Chettle N. J., Wyeth P.J. // Br. Vet. J. – 1988. – №144. – С. 282–287.
6. Головки, А. Н. Способы и методы культивирования вирусов / А. Н. Головки. Микробиологические и вирусологические методы исследования в ветеринарной медицине. – Х., 2007. – С. 173–192.
7. Методические рекомендации по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц с использованием серологических реакций Ч.1 / ФГУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2008. – 306 с.
8. Очищення та концентрування антигену реовірусної інфекції птиці для конструювання діагностичного ІФА / Рябінін С. В. // Проблеми зооінженерії та вет. медицини. – Харків. - 2011. - №23. - С. 203-205.
9. Тест-система для определения антител к возбудителю реовирусной инфекции кур / С. В. Рябинин // Ежеквартальный научно-производственный журнал «Вестник ветеринарии». – 2013. – № 66. – С. 11–14.
10. РНГА -діагностика метапневмовірусної інфекції птиці / Л. І. Наливайко, [та інш.] // Ветеринарна медицина України. – 2012. – № 1(191). – С. 34–36.
11. Диагностика метапневмовирусной инфекции птиц: научное издание / Б. Б. Трефилов, Н. В. Никитина // Ветеринарная практика – 2013. – № 2. (61). – С. 5–10.