

УДК 619:616.98:578.834.11:635.5

*А.П. КУБАЄВ, ветлікар,**Є.О. КРАСНОБАЄВ, кандидат ветеринарних наук**Інститут ветеринарної медицини НААН,**Л.А. ДУДНІКОВ, кандидат ветеринарних наук**НВП "Біо-Тест-Лабораторія",**О.Г. МАРТИНЮК, кандидат ветеринарних наук**Національний університет біоресурсів і природокористування України*

Вивчення імунобіологічних властивостей клонованого вірусу інфекційного бронхіту курей Н-120 в якості вакцини

Не дивлячись на широке використання вакцин, інфекційний бронхіт курей (ІБК) залишається серйозною проблемою для промислового птахівництва. Вибір відповідної вакцини базується на знанні типів вірусу інфекційного бронхіту (ВІБ) що поширені в регіоні. Актуальними сероваріантами ВІБ для України є Massachusetts і 793/В. У роботі представлені результати вивчення нешкідливості і імуногенності матрового ВІБ Н-120 Клону 311 серотипу Massachusetts і виготовленої з нього експериментальної серії вакцини "Бронхівак-1". Показана їх нешкідливість для ВПФ курчат та ефективність що склала 90% і 100% для курчат вакцинованих матровим ВІБ Н-120 К311 і експериментальною вакциною "Бронхівак-1" відповідно проти зараження вірулентним ВІБ М-41.

Інфекційний бронхіт курей (ІБК), вірус інфекційного бронхіту (ВІБ), вакцинний штам Н-120 (ВІБ Н-120), жива вакцина, серотип Massachusetts, вільні від патогенної флори (ВПФ) курячі ембріони (КЕ), нешкідливість, імуногенність, антигенність

Інфекційний бронхіт курей (ІБК) – висококонтагіозне, респіраторне вірусне захворювання курей різного віку, яке викликається коронавірусом птахів. ІБК став економічно значимим захворюванням внаслідок зниження яєчної продуктивності і якості яєць, низького приросту маси тіла та зниження конверсії корму. Втрати зниження продуктивності зазвичай перевищують втрати від смертності, хоча останнє економічно важливе для бройлерної промисловості. Крім того, ІБК являється компонентом змішаних інфекцій, які спричиняють аеросакуліти, що призводить до підвищення смертності і вибраковки тушок бройлерів у процесі їх переробки [1, 2]. Загалом патологічний вплив робить ІБК головною причиною втрат, обумовлених вірусними респіраторними інфекціями птахів. ІБК фактично розповсюджений глобально, а в США дана патологія внесена в список респіраторних захворювань як найбільш

важливе джерело економічних втрат в бройлерній промисловості [3]. Збитки від захворювання складають мільярди доларів щорічно [4].

Збудник захворювання – РНК-місткий коронавірус, убіквітарний для більшості країн, де ведеться промислове птахівництво, який здатний до швидкого поширення серед сприйнятливого птахопоголів'я [2]. Висока мінливість і природна здатність до поширення захворювання ускладнює та підвищує затрати на спроби попередити захворювання шляхом імунізації. У світі нараховується десятки серотипів і генотипів ВІБ. Так, в різних регіонах і країнах, окрім загальнопоширених серотипів ВІБ, існують свої власні, аборигенні, економічно значимі типи ВІБ [5]. У США типами ВІБ, які найчастіше ідентифікують, являються Arkansas (42,4%), Connecticut (13,4%) і Massachusetts (10,2%) [2,6]; у країнах Західної Європи частіше виявляють генотипи

793/В (33,8%), Massachusetts (24,1%), Italy-02 (12,6%), QX-подібні (10%) [7, 8]; у Російській Федерації переважають ізоляти типу Massachusetts (41,8%), Європейські типи (793/В, D274 та ін. – 24,2%) і аборигенні російські ізоляти (29,7%) [9]. Аналіз епізоотичної ситуації по інфекційному бронхіту курей в Україні впродовж 2007-2011 років виявив домінуюче розповсюдження і актуальність сероваріантів групи Massachusetts і 793/В [10, 11], а також наявність QX-подібних варіантів.

Інфекційний бронхіт відноситься до найскладніших з точки зору профілактики [2, 4]. Кращою стратегією і єдиним способом контролю захворювання та зниження втрат є вакцинація з використанням живих і інактивованих вакцин [3]. При цьому головну роль відіграють живі вакцини, які зазвичай застосовують для вакцинації бройлерів і молодняку яєчного напряму продуктивності промислового та батьківського стад [2, 6].



При виборі вакцин вкрай важливою умовою ефективної імунoproфілактики є антигенна відповідність вакцинних штамів польовим ізолятам ВІБ поширеним в даній місцевості, оскільки добре відомо, що гетерологічний захист, як правило, незначний або відсутній.

Однією з небагатьох живих вакцин, яка володіє гетерологічним захистом, є вакцина із штаму H-120 серотипу Massachusetts [12]. Вакцина із цього штаму найбільш часто використовується проти ІБК у світі, а в деяких країнах дозволені для використання вакцини тільки цього серотипу [6, 8, 13]. Навіть сьогодні, при наявності нових антигенно відмінних типів і варіантів ВІБ, завдяки своїм властивостям вона входить до складу схем вакцинацій. Очевидно, з цих причин живі вакцини цього штаму виробляються практично всіма провідними світовими виробниками ветеринарних біологічних препаратів для птахівництва (Schering-Plough / Intervet, Boehringer Ingelheim / Fort Dodge та ін.).

На жаль, до останнього часу з понад чотирьох десятків зареєстрованих в Україні живих вірусвакцин проти ІБК жодного зразка вакцини зі штаму H-120 серотипу

Massachusetts вітчизняного виробництва не було представлено, що і обумовило необхідність її створення. Така робота проводилась двома провідними біотехнологічними центрами України – Інститутом ветеринарної медицини НААН та ООО “Біо-Тест-Лабораторія” з використанням вільних від патогенної флори (ВПФ) курячих ембріонів (КЕ).

Сучасними вимогами при розробці, виробництві і контролі живих вакцин для птахівництва, які регламентуються міжнародними стандартами (МЕБ, Європейська Фармакопея), є використання ВПФ-біотехнології. Це пов'язано з проблемою можливої прихованої контамінації вакцинних препаратів сторонніми збудниками, що при промисловому веденні птахівництва набуває все більшого значення [14-16]. Не дивлячись на високу вартість ВПФ – інкубаційних яєць, переваги безпечного виробництва і тестування перевищують затрати використання цієї системи [14].

На першому етапі цієї роботи було проведено підготовку вакцинного штаму H-120 (адаптацію та клонування на ВПФ-КЕ) [17]. Далі вивчали культуральні властивості ВІБ H-120 Клон 311 [18].

Метою даної роботи було вивчення імунобіологічних властивостей (нешкідливості імуногенності) отриманої матрової розплідки ВІБ H-120 Клон 311 і виготовленої з неї експериментальної живої вакцини “Бронхівак-1”.

Матеріали і методи досліджень. Для вивчення імунобіологічних властивостей використовували курчат різного віку, отриманих шляхом інкубації ВПФ-інкубаційних яєць фірми VALO BioMedia GmbH (Німеччина). До необхідного віку курчат вирощували у віварії ІВМ в умовах ізоляції; годували і напували ad libitum.

Для дослідження нешкідливості формували групу із 10-и курчат добового віку, яким вводили 10-разову дозу вакцини (104,5 ЕІД₅₀/0,1 см³/гол.) матрового ВІБ H-120 К311 або експериментального зразка вакцини “Бронхівак-1” відповідно. Метод імунізації – окулярний, шляхом індивідуального закапування по 0,1 см³/гол. вірусного матеріалу в кожне око. За курчатами спостерігали двічі на день впродовж 21-ї доби на предмет появи будь-яких ознак захворювання або загибелі.

Оцінку імуногенності проводили за результатами зараження контрольних і дослідних груп курчат (по 10 голів у кожній) у 7-тижневому віці штамом-пробійником ВІБ M-41 у дозі 104,5 ЕІД₅₀/0,1 см³/гол. шляхом постановки тесту на ціліостаза (ЦС) на 4-6-й день після зараження (ДПЗ). Курчат дослідних груп попередньо щеплювали у 4-тижневому віці одноразовою вакцинальною дозою (103,5 ЕІД₅₀/0,1 см³/гол.) матрового ВІБ H-120 К311 або експериментального зразка вакцини “Бронхівак-1” відповідно. Метод введення назальний, шляхом індивідуального закапування по 0,1 см³/гол. вірусного матеріалу у ніздрі.

У літературі неодноразово описувалась ефективність методу дослідження імуногенності за допомогою ціліостазного тесту і порівнянність його результатів з іншими методами оцінки ефективності захисту. До того ж він є альтернативним виділенню заражаю-

чого вірусу [19-20]. У нашій лабораторії також позитивно оцінена можливість використання і показана висока чутливість даного методу дослідження.

Суть методу полягає у дослідженні під малим збільшенням мікроскопа (80^X) 10 кілець трахеї від кожного курчати, отриманих з верхньої, середньої і нижньої її частини [20]. Оцінку ЦС проводили в балах, від 0 до 4. Критерій оцінки: 0 балів – 100% циліарної активності (ЦА); 1 бал – 75% ЦА; 2 бали – 50% ЦА; 3 бали – 25% ЦА; 4 бали – 0% (відсутність) ЦА. Циліарна активність на рівні 50-100% (загальна кількість балів циліостазу менше 20) вказує на захисну дію використаного для вакцинації вірусу. Активність ворсинчастого епітелію трахеї менше 50% говорить про пошкоджуючу дію заражаючого референтного вірусу.

Вірус інфекційного бронхіту:

– матрова розплодка ВІБ Н-120 Клон 311 (K311) серотипу Massachusetts. Вірус напрацьований в алантоїсній порожнині 9-10 денних ВПФ-КЕ. Титр інфекційності складає 7,6 ІД₅₀/см³;

– експериментальна серія (№1) вакцини “Бронхівак-1” 500 доз;

– референтний вірулентний ВІБ штаму М-41 (ВІБ М-41) серотипу Massachusetts отриманий IBM з Veterinary Laboratory Agency (Weybridge, United Kingdom) і розмножений у 9-10 денних ВПФ-КЕ. Титр інфекційності складає 7,2-7,8 ІД₅₀/см³.

Результати досліджень. У перших двох дослідях вивчали нешкідливість і імуногенність матрового ВІБ Н-120 К311.

Введення курчатам добового віку 104,5 ІД₅₀/гол. (10 вакцинальних доз) закапуванням в око матрового ВІБ Н-120 К311 не викликало у них жодних клінічних ознак захворювання або загибелі впродовж 21 дня спостереження. Курчата залишались активними, не проявляли ознак занепокоєння або депресії. Ці результати свідчать про нешкідливість даної матрової розплодки.

У досліді по вивченню імуногенності матрового ВІБ Н-120 К311

1. Результати тесту на циліостаз у вакцинованих матровим ВІБ Н-120 і невакцинованих курчат на 4-й і 6-й день після зараження вірулентним М-41 ВІБ

Група	Циліостаз епітелію трахеї курчат, бали, на:										Загальна кількість курчат з циліостазом
	4 ДПЗ*					6 ДПЗ:					
	№ курчати					№ курчати					
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
Контрольна + М-41 ВІБ	40**	40	39	39	36	38	39	33	40	36	10/10***
Вакциновані матровим ВІБ Н-120 + М-41 ВІБ	4	7	3	9	26	2	15	5	2	8	1/10

Примітка: * – ДПЗ – день після зараження; ** – циліостаз на рівні 20-40 балів вказує на пошкодження ворсинчастого апарату трахеї курчат під дією ВІБ М-41; *** – чисельник – кількість хворих курчат; знаменник – загальна кількість курчат групи.

2. Результати тесту на циліостаз у вакцинованих живою вірусвакциною “Бронхівак-1” і невакцинованих курчат на 4-6-й день після зараження вірулентним М-41 ВІБ

Група	Циліостаз епітелію трахеї курчат, бали, на:										Загальна кількість курчат з циліостазом
	4 ДПЗ*					6 ДПЗ					
	№ курчати					№ курчати					
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
Контрольна + М-41 ВІБ	37**	40	40	34	38	40	38	40	35	38	10/10***
Вакциновані вакциною “Бронхівак-1” + М-41 ВІБ	3	0	8	2	11	13	0	1	4	2	0/10

Примітка: * – ДПЗ – день після зараження; ** – Циліостаз на рівні 20-40 балів вказує на пошкодження ворсинчастого апарату трахеї курчат під дією ВІБ М-41; *** – чисельник – кількість хворих курчат; знаменник – загальна кількість курчат групи.

після контрольного зараження групи вакцинованих курчат вірулентним штамом М-41 ВІБ (через 3 тижні після вакцинації) клінічних ознак захворювання не спостерігали. У 4 із 10 курчат контрольної, невакцинованої, групи відмічали легкі ознаки респіраторного захворювання (хрипи, чихання) і незначну депресію. Решта курчат контрольної групи залишалась клінічно здоровими.

На 4-й і 6-й день після зараження провели діагностичний забій

курчат і дослідили кільця трахеї наявність циліостазу миготливого епітелію трахеї цих курчат. У табл. 1 представлені результати цих досліджень.

На 4-й ДПЗ зупинку роботи миготливого епітелію трахеї у курчат, вакцинованих матровим ВІБ Н-120 К311, спостерігали тільки у одного з п'яти курчат, тоді як на 6-й ДПЗ у жодного із курчат, що залишились, циліостаз не спостерігали. У всіх курчат контрольної групи відмічають практично повну

3. Зведені результати досліджень сироваток крові курчат, вакцинованих матровим вірусом Н-120 і живою вакциною “Бронхівак-1”, в ІФА через 3 тижні після вакцинації

Вірус, використаний для вакцинації	Група	Кількість досліджуваних сироваток	Титри ВІБ-специфічних антитіл в ІФА
Матровий клонований ВІБ Н-120 К311	Контрольна	5/10*	0**
	Дослідна	5/10	2196-5547
Вакцина “Бронхівак-1”	Контрольна	5/10	0-58
	Дослідна	5/10	835-2828

Примітка: * – чисельник – кількість позитивно-реагуючих сироваток; знаменник – загальна кількість досліджуваних сироваток групи; ** – ВІБ-специфічні антитіла в ІФА на рівні > 397 вважають як позитивний результат.

відсутність роботи циліарного епітелію трахеї. В цілому, 90% курчат дослідної групи (щеплені матровим Н-120 ВІБ) являються здоровими, тоді як 100% курчат контрольної групи позитивно реагують на зараження вірулентним штамом ВІБ М-41.

У дослідях по вивченню нешкідливості і імуногенності виготовленої із матрового ВІБ Н-120 К311 експериментальної живої вакцини “Бронхівак-1” отримали приблизно аналогічні результати. При введенні кожному курчаті одностороннього віку 10 доз вакцини (104,5 ЕІД50/гол) у птиці не спостерігали жодних клінічних ознак захворювання або відхилень у поведінці впродовж 3 тижнів спостереження, що також вказує на нешкідливість цього препарату.

При вивченні імуногенності експериментальної живої вакцини “Бронхівак-1” після зараження вірулентним штамом М-41 ВІБ у вакцинованих курчат клінічних ознак захворювання не спостерігали. Натомість, у половини курчат контрольної, невакцинованої, групи відмічали чхання, фиркання, виразні хрипи, а у окремих курчат – пригнічений стан і відставання у розвитку.

У табл. 2 представлені результати досліджень циліарної активності кілець трахеї після діагностичного забою курчат на 4-й і 6-й день після зараження у курчат дослідної і контрольної групи.

На 4-й і 6-й ДПЗ циліарна робота ворсинчастого епітелію трахеї у

всіх курчат контрольної групи практично повністю була відсутня. У групі курчат вакцинованих живою вакциною “Бронхівак-1” циліостаз епітелію трахеї в ці терміни був незначним. Виходячи з цих результатів, 100% курчат, вакцинованих експериментальною живою вакциною “Бронхівак-1”, захищені проти зараження вірулентним штамом М-41 ВІБ, тоді як 100% курчат контрольної групи піддані дії заражаючого ВІБ.

Додатково, у ході вивчення імуногенності матрового ВІБ Н-120 К311 і експериментальної вакцини “Бронхівак-1”, було досліджено їх антигенну активність. Для цього, напередодні контрольного зараження (3 тижні після вакцинації), у половини курчат із кожної групи відібрали проби крові для дослідження в ІФА¹ на наявність ВІБ-специфічних антитіл. У таблиці 3 наведені результати цих досліджень.

Із представлених у таблиці даних видно, що у всіх курчат вакцинованих матровим ВІБ Н-120 К311 або вакциною “Бронхівак-1” присутні ВІБ-специфічні антитіла і у жодного курчати із контрольних, невакцинованих, груп антитіл до ВІБ не було виявлено або вони знаходили на рівні, який рахується як негативний результат. Це свідчить про антигенну і біологічну активність матрового ВІБ Н-120 і експериментальної серії вакцини “Бронхівак-1”, хоча прямо і не вказує на їх протективні властивості.

Висновки

1. Отримані результати демонструють, що матровий клонований ВІБ Н-120 К311 нешкідливий для добових курчат, отриманих з ВПФ-КЕ, має антигенну активність та індукує появу ВІБ-специфічних антитіл; володіє достатніми протективними властивостями для захисту 90% курчат при назальному методі щеплення проти зараження вірулентним штамом ВІБ М-41 і може бути використаний у якості виробничого штаму для виготовлення живої вакцини ІВ.

2. Виготовлена із матрового клонованого Н-120 ВІБ у відповідності з вимогами МЕБ і Європейської Фармакопеї експериментальна серія живої вакцини “Бронхівак-1” зберігає властивості матрового вірусу відносно нешкідливості, антигенності і імуногенності, захищаючи при цьому 100% птахів проти зараження вірулентним штамом ВІБ М-41.

3. Загалом, отримані результати вказують на можливість використання вакцини “Бронхівак-1” для профілактики і захисту курей проти ВІБ серотипу Massachusetts.

Несмотря на широкое применение вакцин, инфекционный бронхит кур (ИБК) остается серьезной проблемой для промышленного птицеводства. Выбор соответственной вакцины основан на знании типов вируса инфекционного бронхита (ВИБ), который распространен в регионе. Актуальными серовариантами ВИБ для Украины являются Massachusetts і 793/В. В работе представлены результаты изучения безопасности и иммуногенности матрового ВІБ Н-120 Клона 311 серотипа Massachusetts и произведенной из него экспериментальной серии вакцины “Бронхивак-1”. Показана и безопасность для СПФ – цыплят и эффективность, которая составила 90% и 100% для цыплят, вакцинированных матровым ВІБ Н-120 К311 и экспериментальной вакциной “Бронхивак-1” соответственно

против заражения вирулентным ВИБ М-41.

Инфекционный бронхит кур (ИБК), вирус инфекционного бронхита (ВИБ), вакцинный штамм H-120 (ВИБ H-120), живая вакцина, серотип Massachusetts, свободные от патогенной флоры (СПФ) куриные эмбрионы (КЭ), безопасность, иммуногенность, антигенность

Despite the widespread use of vaccines, avian infectious bronchitis (IB) remains a serious pro-

blem for the poultry industry. Selection of the respective vaccine is based on a knowledge of types of infectious bronchitis virus (IBV), which is spread in the region. Relevant serotypes IBV for Ukraine is Massachusetts and 793/B. The results of this study is the safety and immunogenicity master seed IBV H-120 Clone 311 Massachusetts serotype and produced from it a experimental series of vaccines "Bronhivak-1". It has been shown their safety and

efficiency for SPF chickens, which protected 90% and 100% of chickens vaccinated master seed IBV H-120 Clone 311 and experimental series vaccine "Bronhivak-1" against challenge with virulent IBV M-41.

Avian infectious bronchitis (IB), infectious bronchitis virus (IBV), the vaccine strain H-120 (IBV H-120), the live vaccine, serotype Massachusetts, specific pathogen free (SPF) chick embryos (CE), the safety, immunogenicity, antigenicity

Література

1. Сюрин В.Н. Вирус инфекционного бронхита / В.Н.Сюрин // Вирусные болезни животных. – М.: ВНИТИБП, 1998. – С. 183-198.
2. Cavanagh D., Gelb J. Jr. Infectious bronchitis. / Diseases of poultry, 12th ed. / Y.M. Saif, A..M. Fadly, J.R. Glisson, et al. – Ames: Blackwell Publishing, 2008. – P.117-135.
3. Ignjatovi J. Avian infectious bronchitis virus / J. Ignjatovi , S. Sapats. // Rev Sci Tech. – 2000. – V.19 №2. – P.493-508.
4. Jackwood M. W. Infectious bronchitis – The World Situation / M. W. Jackwood // The Poultry Professional. – 2007. – Issue 92. – P.6-8.
5. Jackwood M.W. Review of infectious bronchitis virus around the world. / M. W. Jackwood // Avian Dis. – 2012. – V 56(4). – P.634-641.
6. De Wit J.J. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures / J. J.De Wit, J. K. A.Cook, H. M. J. F.Heijden // Avian Pathology. – 2011. – V40(3). – P.223-235.
7. Worthington K.J. An RT-PCR survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006 / K.J.Worthington, R.J.W.Currie, R.C. Jones // Avian Pathology. – 2009. – V37(03). – P. 247-257.
8. Jones R.C. Europe: History, Current Situation and Control Measures for Infectious Bronchitis / Jones R.C. // Rev. Bras. Cienc. Avic.. – 2010. – V.12 (2). – P.125-128.
9. Vochkov Y.A. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia / Y.A. Vochkov et al. // Avian Pathol. – 2006. – V. 35. – P. 379-393.
10. Краснобаев Е.А. Инфекционный бронхит кур – современная ситуация, лабораторная диагностика, специфическая профилактика / Е.А.Краснобаев, И.А.Собко, В.В.Килименко, А.П.Кубаев // Сучасна ветеринарна медицина. – 2011. – №1. – С.23-28.
11. Килименко В.В. Инфекционный бронхит кур: анализ текущей ситуации в Украине. Защита от вариантных штаммов возбудителя / В.В. Килименко, Е.А. Краснобаев // Сучасна ветеринарна медицина. – 2012. – №5. – С.14-16.
12. Development and use of the H-strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review / G. Bijlengaa, J. K. A. Cook, J. Gelb [et al] // Avian Pathology. – 2004. – V.33(6). – P.550-557.
13. De Wit J. J. Infectious Bronchitis Virus in Asia, Africa, Australia and Latin America – History, Current Situation and Control Measures / J.J.De Wit, J.K.A.Cook, H.M.Heijden // Revista Brasileira de Ciencia Avicola. – 2010. – V.12 (2). – P.97-106.
14. Jungbdck C. The importance of SPF-Eggs in Manufacturing and Testing of Poultry Vaccines / C.Jungbdck, A.Motitschke // Lohmann information. – 2008. – V. 43(2). – P 41.
15. Dodet B. Viral safety and extraneous agents testing for veterinary vaccines / B.Dodet, W.Hesselinck, C.Jungback [et al] // Biologicals. – 2010. – V.38. – P.326-331.
16. Краснобаев Є.О. Метод вхідного контролю для верифікації ВПФ-статусу курячих SPF-яєць, які використовують при виготовленні живих вакцин проти вірусних хвороб птиці / Є.О. Краснобаєв, О.Є. Краснобаєва, І.О. Собко [та ін.] // Ветеринарна біотехнологія. – 2008. – №13. – С. 278-291.
17. Кубаєв А. П. Клонування вакцинного штаму H-120 вірусу інфекційного бронхіту курей у ВПФ-курячих ембріонах, вивчення його антигенних властивостей та нешкідливості для курчат / А.П.Кубаєв, О.Є.Краснобаєва, О.В.Поліщук // Ветеринарна біотехнологія. – 2009. – Б№15. – С. 209-217.
18. Кубаєв А.П. Вивчення впливу умов культивування на накопичення вірусу інфекційного бронхіту вакцинного штаму H-120 у вільних від патогенної флори курячих ембріонах / А.П.Кубаєв // Ветеринарна біотехнологія. – 2011. –№18. – С. 149-155.
19. Avian infectious bronchitis [Електронний ресурс]: Manual Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 6th ed, OIE. – 2008. – Vol.2. Ch.2.3.2. – 2008. – Режим доступу: http://www.oie.int/eng/normes/MANUAL/A_00107.htm
20. The ciliostasis test - measuring protection against Infectious Bronchitis. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.infectious-bronchitis.com/ciliostasis-test.asp>