

МЕТОД ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ КОРОНАВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО БРОНХІТУ КУРЕЙ

З. С. Клестова¹, д-р вет. наук, професор,
А. К. Вороніна¹, канд. біол. наук,
А. Ю. Ющенко¹, науковий співробітник,
О. С. Ватліцова¹, канд. біол. наук,
Г. В. Дорожінський², канд. техн. наук,
Ю. В. Ушенін², науковий співробітник,
В. П. Маслов², д-р техн. наук, професор,
Т. П. Дорошенко², старший науковий співробітник,
С. О. Кравченко², канд. хім. наук

¹Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів,
вул. Донецька 30, м. Київ, 03151, Україна
zinaklestova@gmail.com alla_voronina@ukr.net

²Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова
Національної академії наук України, пр. Науки 45, м. Київ, 03028, Україна
gvdorozinsky@ukr.net

Використовуючи нанобіосенсор поверхневого плазмонного резонансу (ППР) пристрою «Плазмон-б», в статті представлено розроблений нами новий метод, здатний виявляти вміст вірусу інфекційного бронхіту курей (ІБК) в режимі реального часу в різних буферних розчинах. Метод ППР надчутливо реагує на зміни зовнішніх факторів, в тому числі, при взаємодії антигену (коронавірусу) і специфічних антитіл. Якщо взаємодія не відбувається, резонанс виникає при інших кутових параметрах положення чутливого ППР-елементу по відношенню до лазерного випромінювання. Тому, ППР-метод стає новим ефективним експрес-методом детекції збудників вірусних захворювань, що має важливе значення для ефективного контролю за поширенням інфекційних захворювань. За допомогою приладу «Плазмон-б» показана можливість детекції вірусу ІБК відгуком ППР-сенсору, при попередній іммобілізації антигену або антитіл. Тривалість експерименту складає приблизно 2 год, що значно економить час дослідження порівняно з іншими методами (6–48 годин). Виявляли зміни резонансного кута в межах 360-500 кут. сек при зв'язуванні антигену вірусу ІБК з антитілами сироватки крові у воді (дистильованій). Визначений кутовий зсув резонансу наносенсора при зв'язуванні антигену вірусу ІБК з антитілами сироватки крові у ЗФР, який в середньому складав 354 кутові секунди. Показана можливість застосування методу ППР для експресного виявлення патогену коронавірусних інфекцій тварину рідинах в режимі реального часу. З урахуванням значних соціальних та економічних негативних наслідків, які спричинюють члени родини вірусів Coronaviridae та враховуючи нинішню ситуацію з розповсюдженням в усьому світі патогену COVID-19 в якості модельного об'єкта обрано представника родини коронавірусів – вірус інфекційного бронхіту курей.

Ключові слова: ПОВЕРХНЕВИЙ ПЛАЗМОННИЙ РЕЗОНАНС (ППР), КОРОНАВІРУСИ, ДЕТЕКЦІЯ.

SURFACE PLASMON RESONANCE METHOD FOR DETECTION CHICKEN INFECTIOUS BRONCHITIS CORONAVIRUS

Z. S. Klestova¹, A. K. Voronina¹, A. Yu. Yushchenko¹, O. S. Vatlitsova¹, G. V. Dorozinsky²,
Yu. V. Ushenin², V. P. Maslov², T. P. Doroshenko², S. O. Kravchenko²

¹State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms
State Service of Ukraine on Food Safety and Consumer Protection
zinaklestova@gmail.com alla_voronina@ukr.net

²V.E. Lashkaryov Institute of Semiconductor Physics NAS of Ukraine
National Academy of Sciences of Ukraine
gvdorozinsky@ukr.net

The article presents a new developed method, which is able to detect the chicken infectious bronchitis virus (IBV) antigen in real time in various buffer solutions, using the surface plasmon resonance (PPR) nanobiosensor of the Plasmon-6 device. The PPR method is hypersensitive to changes in external factors, including the interaction of antigen (coronavirus) and specific antibodies. If the interaction does not happen, the resonance occurs at other angular parameters of the position of the sensitive PPR element relative to the laser radiation. Therefore, the PPR method is becoming a new effective rapid technique of viral pathogen detection, which is important for effective control over infectious diseases spreading. The possibility of IBK virus detection by the PPR sensor response, with preliminary immobilization of antigen or antibodies, is shown, involving the device "Plasmon-6". The duration of the experiment is about 2 hours, which significantly saves research time compared to other methods (6-48 hours). The changes in the resonance angle in the range of 360-500 angle. sec when the IBC virus antigen binds to serum antibodies in water (distilled) were detected. The angular shift of the nanosensor resonance was determined when the IBC virus antigen bound to the serum antibodies in the PBS, which averaged 354 angular seconds. The possibilities of using the PPR method for express detection of the coronavirus infections pathogen in animal fluids in real time are demonstrated in article. Taking into account the significant social and economic negative consequences of the *Coronaviridae* virus family members and considering the current situation with the worldwide spread of COVID-19, the representative of the coronavirus family – the Infectious Bronchitis virus has been selected as a model.

Keywords: SURFACE PLASMON RESONANCE (PPR), CORONVIRUSES, DETECTION.

В останні кілька десятиліть віруси є справжньою загрозою для здоров'я людини та тварин. Швидка ідентифікація вірусів має бути одним із найдієвіших способів запобігання спалахам інфекцій (Khan et al., 2020).

Ветеринарна медицина зосереджена на дослідженнях, профілактиці та лікуванні захворювань домашніх, диких тварин та тих, які використовуються в наукових експериментах, Галузі скотарства та птахівництва, які сприяють розвитку економіки, стикаються з проблемами бактеріальних, вірусних та грибкових захворювань, які завдають великих втрат їх виробничому потенціалу. Із розвитком зовнішньо-економічних відносин українське птахівництво все більше стає складовою частиною світового птахівництва (Юпов et al., 2012).

Збудник хвороби ІБК – РНК-геномний вірус з родини *Coronaviridae*, роду *Coronavirus*, який викликає інфекційне вірусне захворювання домашніх птахів.

Таким чином, ІБК є одним з основних джерел економічних втрат у галузі птахівництва (Cavanagh, 2003). На частку ІБК припадає близько 20 % всіх хвороб органів дихання птиці, і

він спричиняє величезні економічні збитки світовому промислому птахівництві (Cavanagh & Gelb, 2008).

Нові серотипи продовжують з'являтися внаслідок мутацій та рекомбінації вірусу, що ускладнює контроль над його поширенням (Chen et al., 2017).

Було розроблено ряд методів діагностики гострого перебігу ІБК на основі виявлення РНК збудника та відповідних антитіл. Ці загальні методи включають імунофлюоресцентний аналіз (van Beurden et al., 2018), тест на осадження в агаровому гелі (AGPT) (Valastro et al., 2016), ізоляцію вірусу (Akan et al., 2007), полімеразну ланцюгову реакцію із зворотною транскрипцією (Ha-Jung et al., 2014) та імуноферментний аналіз (ІФА) (Liu et al., 2019). Незважаючи на чутливість, ці лабораторні методи можуть зайняти багато часу для постановки діагнозу, і вони вимагають ручної праці досвідченого персоналу. Крім того, у деяких районах, де вирощують птицю, немає місцевих лабораторій, які можуть полегшити виявлення збудника ІБК, вимагаючи транспортування зразків, що призводить до затримки діагностики.

Здатність швидко реагувати на біоризики у виробничих умовах на птахофабриках, може принести величезну користь від методів, які, по-перше, можуть швидко виявляти хворих птахів, а по-друге, від пристроїв, які можуть точно і швидко детектувати збудника, який викликав захворювання, а також визначати його в об'єктах санітарно-ветеринарного нагляду, наприклад, у воді. Пристрої, що можуть втілювати це у реальність ґрунтовані на безлічі різних технологій, які включають багато типів біосенсорів та дають проводити експрес-аналізи. Таким чином, розробка надчутливих і швидких методів виявлення ІБК безпосередньо на місці, наприклад, у птахогосподарстві, є дуже перспективною.

Біосенсорний аналіз на основі явища поверхневого плазмонного резонансу (ППР) може відповідати вищевказаним характеристикам. Аналіз ППР використовує високу специфічність та спорідненість антитіл для безпосереднього виявлення неміченого аналіту в майже реальному часі без необхідності очищення або збагачення зразків. Вимірювання ППР засноване на передачі енергії від р-поляризованого освітлювального джерела світла до енергії поверхневої плазмонної хвилі, яка утворюється при резонансному куті падіння світла на металевий наночастинок на межі з діелектриком (Brockman et al., 2000). Метод поверхневого плазмонного резонансу є, як слідує з його назви, резонансним і тому надчутливо реагує на зміни зовнішніх факторів, в тому числі, при взаємодії антигену (коронавірусу) і специфічних сироваток. Якщо взаємодія не відбувається, резонанс виникає при інших кутових параметрах положення чутливого ППР-елемента по відношенню до лазерного випромінювання. За допомогою спеціального програмного забезпечення прилад записує кінетику зміни резонансного мінімуму в реальному часі. Проведення дослідження в реальному часі з високою чутливістю і незначним об'ємом зразка, при портативності самого пристрою, робить цю технологію особливо зручною для виявлення різних вірусів, в тому числі і коронавірусів.

Метою нашої роботи була розробка методу швидкого виявлення коронавірусу ІБК у воді на основі явища ППР, який можна застосовувати у польових умовах (в умовах пташників).

Матеріали і методи. Методичною основою запланованих досліджень є теоретичні загальнонаукові прийоми досліджень і методи, що ґрунтуються на сучасних наукових засадах з розробки нових методів детекції патогенів вірусних захворювань тварин, а також фізичних основ ППР.

Для проведення дослідження методом ППР взаємодії антиген-антитіло коронавірусу ІБК застосовували його антиген та гіперімунні специфічні сироватки крові, що містили специфічні антитіла до ІБК.

Референт-стандарт коронавірусу (позитивний матеріал): вірус ІБК, варіантний штамп «1/96», що відноситься до генетичної групи 793В. Вірусмісний матеріал у вигляді екстраембріональної рідини було накопичено в об'ємі 18,0 см³ шляхом зараження вірусом ІБК курячих ембріонів, що розвиваються (РЕК) 9-добового віку, та культивування їх протягом 120 годин за температури 37±0,5 °С та відносній вологості 60-70 %. Було визначено (в повторах)

інфекційну активність отриманого нами вірусу шляхом титрування його в РЕК. Встановлено, що титр вірусу складав $6,03 \pm 0,32 \lg \text{ЕІД}_{50\text{см}^3}$. Вірусутримуючу рідину зберігали у холодильнику за температури -20°C .

Негативний стандарт (контроль): екстраембріональну рідину від неінфікованих РЕК було отримано в об'ємі $8,0 \text{ см}^3$ шляхом відбору матеріалу від курячих ембріонів 14-добового віку, що розвиваються. Контрольні (неінфіковані) РЕК знаходились в термостаті, окремо від інфікованих, 120 годин за температури $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ та відносній вологості 60-70 %. Відібрана екстраембріональна рідина зберігалась у холодильнику за температури -20°C .

Відбір зразків крові та отримання сироватки проводили за дотримання правил асептики і антисептики. Зразки крові від курчат (хворих ІБК, вакцинованих та забитих з діагностичною метою) витримували в термостаті протягом 2 годин за температури 37°C , розміщували в холодильнику за температури 4°C на 10–12 годин. Відстояну сироватку крові відбирали в окремі пробірки. Всі процедури проводили в стерильних умовах. Визначили титр антитіл, специфічних до коронавірусу ІБК в ІФА, що склав 1:5824.

Гіперімунні специфічні сироватки крові від курчат, щеплених вірусом ІБК (варіантним штамом «1/96», що відноситься до генетичної групи 793В). Сироватка крові була досліджена на специфічну активність в ІФА з використанням діагностичної системи, виробництва компанії Біочек (Нідерланди).

На основі методу ППР Інститутом фізики напівпровідників імені В. Є. Лашкарьова НАН України, розроблений спектрометр "Плазмон-6", здатний виявляти патогенні мікроорганізми у воді та в біологічних рідинах. Розроблений метод ППР дозволяє здійснювати моніторинг змін у досліджуваних зразках у реальному часі, і у 8 разів (порівняно з ПЛР) скорочує час на виявлення патогенів і не вимагає використання дорогих реагентів. Рішення вже запатентоване в Україні та отримана міжнародна РСТ-заявка (Venger et al. 2020). Чутливий сенсорний елемент – розробка винахідників Інституту фізики напівпровідників НАНУ (під керівництвом проф. В. П. Маслова, групи В. Ю. Ушеніна, канд. хім. наук С.О. Кравченко), переданий разом з приладом «Плазмон-6» до ДНКІБШМ.

Перетворювачем оптичного сенсору є тонка золота плівка, товщиною $50 \pm 2 \text{ нм}$, яка розташована між двома середовищами з різним коефіцієнтом заломлення – склом і досліджуваним розчином. Остання поєднувалась з призмою оптичного приладу за допомогою імерсійної рідини (поліфенілового ефіру) з коефіцієнтом рефракції 1,61.

Дослідження взаємодії антиген-антитіло проводили відповідно до схем експерименту, наведених в таблицях 1, 2.

При взаємодії антиген-антитіла спостерігався кутовий зсув мінімуму резонансної характеристики ППР у часі. Після взаємодії чутливий елемент промивали дистильованою водою або ЗФР для вилучення не зв'язаних залишків сироватки та антигену.

Таблиця 1

Схема проведення експерименту при зв'язуванні антигену ІБК з антитілами при попередній іммобілізації антигену вірусу ІБК на пластині, вкритій шаром золота

Етапи	Розчини	Тривалість, (хв)	Швидкість, (мкл/хв)	Концентрація
1	Дистильована вода/ЗФР	10	50	
2	Антиген вірусу ІБК	60	10	Розведення 1:10
3	Дистильована вода/ЗФР	10	50	
4	Гіперімунні сироватки	60	10	Розведення 1:100
5	Дис. вода/ЗФР	10	50	

Примітка: ЗФР – забуферений фізіологічний розчин

Схема проведення експерименту при зв'язуванні антитіл з антигеном при попередній іммобілізації антитіл до вірусу ІБК на пластині, вкритій шаром золота

Етапи	Розчини	Тривалість, хв	Швидкість, мкл/хв	Концентрація
1	Дистильована вода	10	50	
2	Гперімунні сироватки	40	10	Розведення 1:100
3	Дистильована вода	10	50	
4	Антиген вірусу ІБК	40	10	Розведення 1:10
5	Дистильована вода	10	50	

Статистична обробка результатів досліджень. Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням MS Excel. Дані наведені як середнє значення \pm похибка середнього значення ($M \pm m$). Аналіз вірогідності результатів експерименту проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Різницю між показниками досліду та контролю вважали статистично вірогідною при $p < 0,05$.

Результати й обговорення. Нами було досліджено утворення комплексу антигену із специфічними антитілами при попередній сорбції антитіл позитивних сироваток на сенсорній пластині з подальшим зв'язуванням з антигеном вірусу ІБК. Показано, що за даних умов експерименту фізична іммобілізація антитіл на поверхні наносенсору є стабільною і не змінюється при промиванні вимірювальної кювети дистильованою водою. Ми спостерігали зсув резонансного кута у межах 1650-1800 кут. сек (рис. 1).

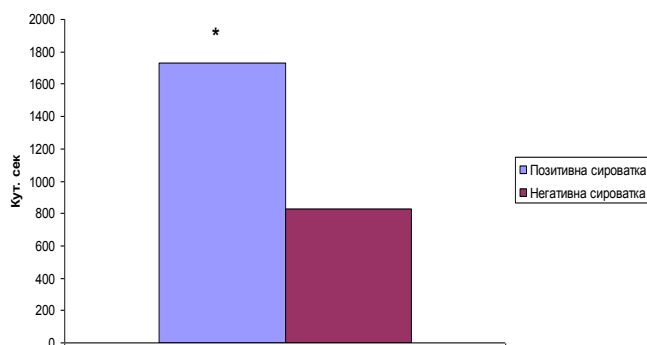


Рис. 1. Середні значення іммобілізації сироваток на сенсорній поверхні з нанесенням шару чистого золота у дистильованій воді.

Примітка: тут і далі * - вірогідні зміни порівняно з негативною сироваткою (* - вірогідна різниця, $p \leq 0,05$).

При подальшій взаємодії антигену вірусу інфекційного бронхіту курей, утворення на поверхні сенсора комплексу антиген-антитіло зумовлювало появу специфічного сигналу. На рис. 2 представлені середні значення отриманих даних.

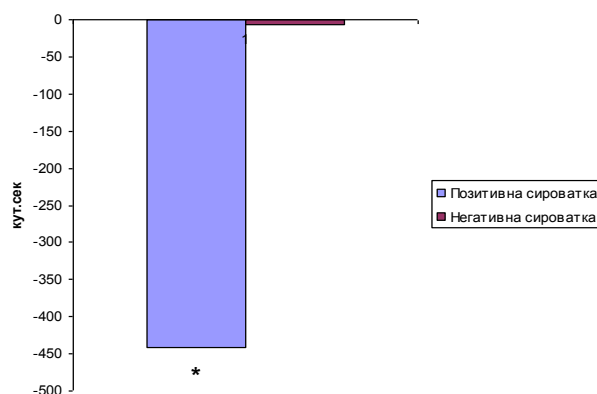


Рис. 2. Середні значення величини відхилення резонансного кута наносенсора при зв'язуванні антигену вірусу ІБК з антитілами сироватки курей (у дистильованій воді), (* - вірогідна різниця, $p \leq 0,05$).

Встановлено, що при дослідженні специфічних сироваток, отриманих від хворих птахів, даний експрес-метод на основі ППР дозволяє реєструвати комплекс антигену з антитілами при 100-кратних розведеннях сироватки. При цьому реєстрували зсув кута мінімуму резонансної характеристики ППР у часі в межах 360-500 кут. сек. При такому розведенні (1:100) контрольні негативні сироватки не викликали зміни резонансного кута. При наявності комплексу антиген-антитіло у досліджуваному розчині середнє значення кутового зсуву становило 441,9 кут. сек для позитивної сироватки і 7,2 кут. сек для негативної сироватки (що більше, ніж у 60 разів).

В даних експериментах тривалість взаємодії («прокачування») антигену вірусу ІБК і сироваток через кювету становила 40 хвилин. При порівнянні показників кутового зсуву при утворенні комплексів антиген-антитіло за умов «прокачування» антигену протягом 30 і 40 хв вказують на можливість скорочення аналізу на етапі зв'язування до 30 хв, оскільки даний показник залишається практично незмінним і подальше «прокачування» розчину антигену через кювету не є доцільним.

Також було проведено дослідження взаємодії антигену ІБК і позитивної сироватки при використанні для їх розведення дистильованої води і ЗФР. При цьому їх «прокачували» через кювету протягом 60 хв. На рисунку 3 наведені експериментальні дані взаємодії антиген-антитіло при попередній іммобілізації антигену на поверхні чутливого елемента приладу «Плазмон-6» у дистильованій воді та ЗФР.

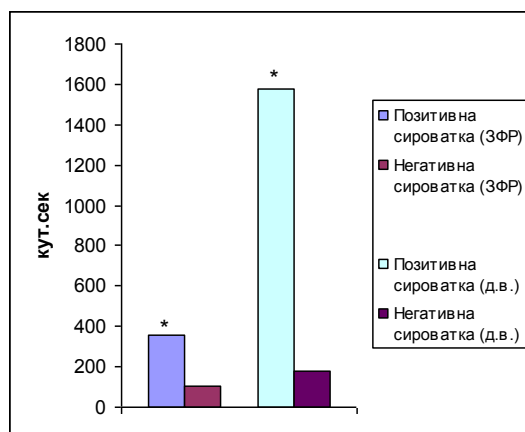


Рис. 3. Відхилення резонансного кута наносенсора приладу «Плазмон 6» при зв'язуванні антигену вірусу ІБК з антитілами сироватки у дистильованій воді та ЗФР (* - вірогідна різниця, $p \leq 0,05$).

Коли іммобілізація антигену ІБК тривала 60 хв, при використанні для розведення антигену і сироваток дистильованої води, кутовий зсув резонансу складав $\Delta\theta = 1578 \pm 138,1$ кутових секунд, а при використанні ЗФР даний показник становив $\Delta\theta = 354 \pm 6,7$ кутових секунд. Дані, представлені на рисунку 3 свідчать, що спостерігається відповідний кутовий зсув мінімуму резонансу в результаті зміни рефракції показчика на поверхні чутливого елемента наносенсору ППР за умов застосування як дистильованої води, так і ЗФР.

Використання різних буферів для приготування розведень антигенів та специфічних сироваток впливає на результат дослідження – у разі приготування розведень у дистильованій воді ми реєстрували у 4,5 рази більший відгук при утворенні комплексу антиген-антитіло у дистильованій воді ніж при використанні ЗФР.

В результаті досліджень було встановлено, що найбільший кутовий зсув ППР при утворенні комплексу антиген-антитіло спостерігався при попередній іммобілізації антигену з подальшим зв'язуванням з антитілами та використанні як розчинника дистильованої води. Слід зазначити, що загальний час експерименту складає лише 2 – 2,5 години, включаючи час на іммобілізацію антигену або антитіл, утворення комплексу антиген-антитіло та промивання виміральної кювети.

Опираючись на результати минулих досліджень з іншими вірусами, де використання SAM-покриття було необхідним для іммобілізації антигенів на поверхні чутливого елемента (Klestova et al., 2019), ми вивчили також можливість детекції коронавірусів за аналогічних умов експерименту. Експериментальні дані представлені на рисунках 4, 5.

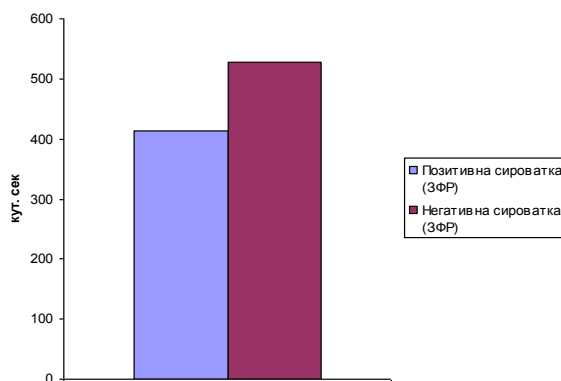


Рис. 4. Середні значення іммобілізації коронавірусу ІБК при використанні SAM-покриття у ЗФР.

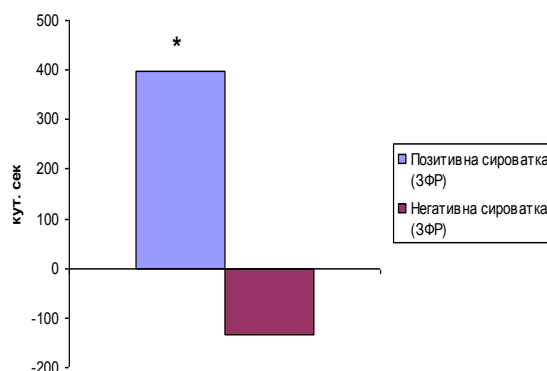


Рис. 5. Середні значення величини відхилення резонансного кута наносенсора при зв'язуванні антигену вірусу ІБК з антитілами сироватки у ЗФР. (* - вірогідна різниця, $p \leq 0,05$).

Було встановлено, що саме у випадку взаємодії антигену ІБК з антитілом методом поверхневого плазмонного резонансу дослідження необхідно проводити на чутливому елементі без використання функціонального покриття, тобто на сенсорі з покриттям з чистого золота. Даний феномен можливо пояснити самою структурою віріону вірусу ІБК, оскільки наявність пепломерів на поверхні віріону ускладнює іммобілізацію антигену на неоднорідному SAM-покритті. Окрім того, експерименти безпосередньо на поверхні сенсору з чистого золота не потребують активації поверхні сенсору, що скорочує час дослідження на 1 годину і усуває супутні витрати на реактиви.

Поверхневий плазмонний резонанс – це метод виявлення змін показника заломлення лазерного променя на поверхні датчика. Оскільки маса комплексу антиген-антитіло накопичується на поверхні датчика під час взаємодії зв'язування, показник заломлення кута променя збільшується і спостерігається посилення сигналу.

В даній роботі, на основі отриманих експериментальних даних, ми показали можливість використання явища ППР для використання у новому експрес-методі для детекції коронавірусів у різних рідинах на моделі коронавірусу інфекційного бронхіту курей.

Існуючі методи діагностики вірусної інфекції довготривалі, менш чутливі (РІД – 24 години) або дуже складні і дорогі (ІФА і ПЛР). Альтернативним методом діагностики є метод на основі явища ППР. Це було експериментально нами продемонстровано, що застосування

цього експрес-методу ідентифікує утворення комплексу антиген-антитіло при незначних концентраціях і значно зменшує тривалість діагностики, яка складає біля 2–ох годин. Це можна пояснити наступним чином: за цей час більшість рецепторів вірусу зайняли свої положення в просторі, і їх подальша взаємодія з антитілами стала неможливою і тому збільшення часу наступного етапу зв'язування не є доцільним.

При іммобілізації антитіл позитивної сироватки на сенсорі із наночастиною з чистого золота спостерігався негативний відгук при специфічній взаємодії з антигеном. В такому разі, можливо, можемо говорити про метод зворотної взаємодії: за якої при специфічній взаємодії утворюються комплекси антиген-антитіло, що видаляються з поверхні чутливого наносенсора при проведенні процедури промивання виміральної кювети.

Таким чином, показана можливість вимірювання індукованих ІБК антитіл у сироватці крові хворих птахів з використанням наносенсора в експрес-методі детекції патогену ІБК на основі поверхневого плазмонного резонансу.

ВИСНОВКИ

Розроблений новий недорогий метод швидкого виявлення коронавірусу у рідинах в режимі реального часу, який дозволяє пришвидшити детекцію патогену.

Перспективи досліджень. Ефективність розробки експрес-тестування для виявлення коронавірусів з використанням ППР в порівнянні з існуючими полягає в можливості в реальному часі спостерігати та вивчати взаємодію антиген-антитіло за суттєвого скорочення часу досліджень. Результати досліджень у майбутньому будуть використані для створення і застосування нового експрес-методу детекції коронавірусів в медицині та ветеринарії як найдешевший альтернативний діагностичний метод.

References

- Akan, M., Izgur, M., Sareyyupolu, B. (2007). Diagnosis of infectious bronchitis in chickens by polymerase chain reaction and fluorescent antibody technique. *Veteriner Fakültesi Dergisi*, 54(1), 47-54.
- Brockman, G., Nelson, P., Corn, R. (2000). Surface plasmon resonance imaging measurements of ultrathin organic films. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 51, 41-63. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.51.1.41>
- Cavanagh, D. (2003). Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.*, 32, 567–582. <https://doi.org/10.1080/03079450310001621198>
- Cavanagh, D. & Gelb, J. (2008). Infectious Bronchitis. In: Saif, Y.M. (Ed.), *Diseases of Poultry* 12th Ed. Blackwell Publishing Ltd., Ames, Iowa, 117–135.
- Chen, Y., Jiang, L., Zhao, W., Liu, L., Zhao, Y., Shao, Y., Li, H., Han, Z., Liu, S. (2017). Identification and molecular characterization of a novel serotype infectious bronchitis virus (GI-28) in China. *Veterinary Microbiol*, 198, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.017>
- Ionov, I.A., Tereshenko, O.V., Katerinich, O.O. (2012). Promising program «Development of the poultry industry until 2020», *Efektivne ptakhivnicztvo*, 10, 12-22. [in Ukrainian].
- Ha-Jung, R., Hilt, D., Jackwood, M. (2014). Detection of infectious bronchitis virus with the use of real-time quantitative reverse transcriptase-PCR and correlation with virus detection in embryonated eggs. *Avian Dis.*, 58, 398–403. <https://doi.org/10.1637/10764-010914-Reg.1>
- Khan, M., Hasan, M., Hossain, S., Ahommed, M., Daizy, M. (2020). Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: state of the art. *Biosens. Bioelectron.*, 166, 112431–112444. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112431>

Klestova, Z.S, Yushchenko, A.Yu., Blotska, O.F, Maslov, V.P, Ushenin, Yu.V., Dorozhynsky, G.V, Kravchenko, S.O., Dorozhynska, G.V. (2019). Experimental and Theoretical Substantiation of the Express Method Development for Detection of Enteroviruses in Water by Surface Plasmon Resonance Method. *Intern. Innov Biosyst Bioeng*, 3(1), 52–60. <https://doi.org/10.20535/ibb.2019.3.1.163106>

Liu I., Lin Y., Jian C., Cheng I., Chen H. (2019). A novel immunochromatographic strip for antigen detection of avian infectious bronchitis virus. *Int J. Mol. Sci.*, 20, 2216–2226. <https://doi.org/10.3390/ijms20092216>

Valastro, V., Holmes, E., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M., Cattoli, G., Monne, I. (2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: an attempt to harmonize virus classification. *Infect Genet Evol.*, 39, 349–364. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.015>

Van Beurden, S., Berends, A., Kramer-Kuhl, A., Spekreijse, D., Chenard, G., Philipp, H., Mundt, E., Rottier, P., Verheije, M. (2018). Recombinant live attenuated avian coronavirus vaccines with deletions in the accessory genes 3ab and/or 5ab protect against infectious bronchitis in chickens. *Vaccine*, 36, 1085–1092. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.01.017>

Venger, E., Maslov, V., Ushenin, Yu., Kravchenko S., Dorozhynskyi G., Holovko, A., Klestova, Z., Blotskaya, O., Yushchenko, A. (2020). Sposob izgotovleniya chuvstvitelnogo elementa immunosensora na osnove yavleniya poverkhnostnogo plazmonnogo rezonansa dlya diagnostiki lejkoza krupnogo pogatogo skota. *Mezhdunarodnyj petent WO 2020/018060 A1 2020*. [in Ukrainian].