

ГЛАВА 3.3.3.

ИНФЕКЦИОННЫЙ ЛАРИНГОТРАХЕИТ ПТИЦ

РЕЗЮМЕ

Инфекционный ларинготрахеит птиц (ИЛТ) это респираторная болезнь, возникающая в результате герпесвируса куриных 1 подсемейства альфагерпесвирусов. Прежде всего, этой болезни подвержены куры, хотя она также может инфицировать фазанов, куропаток и павлинов. Клинические признаки и наблюдаемые патологические реакции могут варьироваться от крайне тяжелых, когда некоторые птицы погибают от удушья, до очень легких, неотличимых от других легких респираторных болезней кур. Главным поражением является трахеит. У инфицированных птиц вирус может стать латентным и впоследствии снова выделяться из организма без клинических признаков.

Лабораторная диагностика основывается на выделении вируса, демонстрации наличия вируса или вирусных антигенов, и выявлении специфичных антител в сыворотке. Во время диагностики может быть полезным гистопатологическое исследование трахеи на предмет характерных внутриядерных включений и синцитиальных клеточных образований.

Идентификация агента: *Выделение вируса можно проводить с помощью инокуляции подозрительных материалов в отслоившуюся хорион-аллантоисную оболочку оплодотворенных куриных яиц, или в эмбриональную культуру клеток птиц. Для данных методов требуется много времени, но они являются чувствительными. К быстрым методам относятся: иммунофлуоресценция экссудата из трахеи или замороженных срезов и твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) для демонстрации вирусных антигенов в соскобах со слизистых оболочках. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) является наиболее чувствительным для исследования клинических материалов, чем выделение вируса, и широко применяется в настоящее время. Характеристика вируса и дифференциация вакцинных и «диких» вирусов возможна с использованием ПЦР с последующим полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов.*

Серологические тесты: *Антитела к вирусу ИЛТ можно выявить посредством тестов нейтрализации вируса, которые проводятся в яйцах или в культурах клеток, или при помощи реакций иммунодиффузии в агаровом геле (AGID), непрямой иммунофлуоресценции или ИФА. Последний метод наиболее предпочтителен для скрининга стад.*

Требования к вакцинам: *Вакцины против ИЛТ обычно изготавливают из аттенуированного живого вируса. Те, которые в настоящий момент имеются в наличии, обеспечивают некоторый уровень защиты, но не являются совершенными. Также коммерчески доступен ряд рекомбинантных вакцин с различным уровнем эффективности защиты.*

А. ВВЕДЕНИЕ

Инфекционный ларинготрахеит птиц (ИЛТ) это респираторное заболевание кур, вызываемое альфагерпесвирусом, герпесвирусом куриных 1. Болезнь также может поражать фазанов, куропаток и павлинов. В вирулентной форме динамика, клинические признаки и очень серьезные поражения трахей являются характерными для болезни, в то время как легкая форма может быть неотличима от других легких респираторных заболеваний. Лабораторная диагностика основывается на демонстрации наличия вируса или вирусных компонентов (Guy & Bagust, 2003; Scholz et al., 1994; Williams et al., 1994) или специфичных антител в сыворотке (Adair et al., 1985; Meulemans & Helen, 1978).

Клинически болезнь может проявляться в трех формах, а именно в острой, подострой и хронической или легкой. В острой форме начало болезни внезапное с быстрым распространением. Заболеваемость высокая и смертность может превышать 50%. Некоторые птицы могут погибнуть в хорошем физическом состоянии до появления характерных признаков, которые включают затрудненное дыхание с увеличением шеи и дыхание с открытым клювом в попытке вдохнуть воздух. Также слышны булькающие, хрипящие звуки и кашель когда птицы пытаются избавиться от обструкции в трахее. Также может наблюдаться конъюнктивит. На полу или стенах помещения можно обнаружить сгустки крови от откашливания. Посмертные изменения ограничены верхними дыхательными путями и также являются характерными, а именно включают в себя геморрагический трахеит со сгустками крови, слизистый ринит и кровянистую слизь по всей длине трахеи.

В подострой форме начало болезни более медленное, а респираторные признаки могут наблюдаться в течение нескольких дней до смерти. Заболеваемость высокая, но смертность ниже, чем при острой форме, от 10% до 30%. Посмертные поражения менее серьезные и представляют собой слизистый экссудат с кровью или без крови в трахее. Можно обнаружить желтые казеозные дифтеритные пленки, прилипшие к гортани и верхней части слизистой трахеи.

Хронический или легкий ИЛТ может наблюдаться у выживших птиц, перенесших любую из вышеперечисленных форм заболевания, хотя некоторые вспышки сами по себе могут быть слабыми. Уровень заболеваемости хроническим ИЛТ в стаде может составлять только 1-2%, при этом большинство зараженных птиц погибает от удушья. Признаки включают в себя приступы кашля и судорожное дыхание, с выделениями из носа и рта, а также сниженную яйценоскость. Воротами инфекции служат верхние дыхательные пути, и передача инфекции происходит наиболее быстро от птиц с острой инфекцией, но клинически бессимптомная инфекция может сохраняться в течение длительного периода с периодическими повторными выделениями вируса, и выздоровевшие птицы-переносчики также являются потенциальными средствами передачи заболевания (Hughes et al., 1987). При патологоанатомическом исследовании наблюдаются дифтеритные и казеозные некротические бляшки и пробки в трахее, гортани и во рту. Вспышки легкого ИЛТ могут поражать большое количество птиц одновременно, и в этом случае макроскопические поражения могут представлять собой только конъюнктивит, синусит и мукоидный трахеит. Если учесть, что передача ИЛТ происходит при тесном контакте, инфекция передается медленнее в птичниках клеточного типа по сравнению с местами, где практикуется свободное содержание птицы, и в птичниках клеточного типа путь инфекции можно выявить. В недавней работе подтвердилась значительная изменчивость среди штаммов вируса ИЛТ в их тропизме для трахеи или конъюнктивы, и штаммы,

предпочитающие конъюнктиву, могут привести к значительному снижению привеса (Kirkpatrick et al., 2006a).

Не известно о существовании риска инфекции ИЛТ для человека. Меры по биологическому сдерживанию должны быть определены с помощью анализа риска, как описано в Главе 1.1.4 *Биобезопасность и биозащита: Стандарты для управления биориском в ветеринарной лаборатории и вивариях.*

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Тесты, доступные для диагностики инфекционного ларинготрахеита птиц и их цели

Метод	Цель					
	Свобода популяции от инфекции	Свобода отдельных животных от инфекции перед перемещением	Содействие политике искоренения	Подтверждение клинических случаев	Распространение инфекции – надзор	Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация агента¹						
Выделение вируса	-	-	-	++	-	-
Иммунофлуоресценция для выявления антигена	-	+	-	++	-	-
выявление антигена (ELISA)	+	++	+	+++	+	-
PCR	++	+++	++	+++	++	-
Гистопатология	-	-	-	++	-	-
Выявление иммунной реакции²						
VN	+	-	+	-	-	+
выявление антитела (ELISA)	++	+	+++	+	+++	+++

+++ = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод; + = может применяться в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность или другие факторы строго ограничивают его применение; - = не подходит для этой цели. Хотя не все тесты, относящиеся к категории +++ или ++, прошли формальную валидацию, их рутинный характер и факт того, что они широко применялись без сомнительных результатов, делает их подходящими.

¹ Рекомендуется комбинация методов идентификации агентов в отношении одного и того же клинического образца.

ELISA = твердофазный иммуноферментный анализ; PCR = полимеразная цепная реакция;
VN = нейтрализация вируса.

1. Идентификация агента

Вирус можно выделить в печени куриных эмбрионов (McNulty et al., 1985), почках куриных эмбрионов (Chang et al., 1960) или в культурах клеток почек кур (Van Kammen & Spadbrow, 1976). Среди них монослой клеток печени куриных эмбрионов оказались наиболее чувствительными (Hughes & Jones, 1988). Вирус также можно вырастить на отслоившейся хорион-аллантоисной оболочке (САМ) 10-12-дневных свободных от патогенной микрофлоры (СПФ) куриных яиц с эмбрионом (Jordan, 1964).

Вызывающий болезнь герпесвирус можно продемонстрировать непосредственно в трахеальном экссудате при помощи электронной микроскопии (Van Kammen & Spadbrow, 1976). Вирусные антигены можно выявить при помощи иммуофлюоресценции (Braune & Gentry, 1985; Wilks & Kogan, 1979), или твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием соскобов со слизистой оболочки трахеи (York & Fahey, 1988). Также может быть полезным гистологическое исследование трахеи на предмет типичных герпесвирусных внутриядерных включений и синцитиальных клеточных образований (Armstrong, 1959; Pirozok et al., 1957). Описывались методы выявления вируса ИЛТ с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), и сообщалось, что ПЦР является более чувствительной по сравнению с выделением вируса (Alexander & Nagy, 1997; Keam et al., 1991; McNulty et al., 1985; Williams et al., 1994).

1.1. Выделение вируса

Когда для выделения вируса отбираются пробы у живой птицы, трахеальные мазки являются более предпочтительными по сравнению с ротоглоточными мазками или мазками с конъюнктивы. Их помещают в транспортную среду, содержащую антибиотики. При отборе материала для выделения вируса при продолжительных вспышках, более эффективным будет выбраковать птицу на ранней стадии заражения, чем пытаться выделить вирус у птицы, которая погибла от асфиксии после длительной болезни. Качество пробы улучшится, если птицу умертвят при помощи барбитурата или другой инъекции, а не методом смещения шейных позвонков. Можно представить целую голову и шею убитых птиц, или только трахею и гортань после их удаления с минимальной контаминацией. Трахеи следует транспортировать в бульоне с антибиотиком для выделения вируса, но если они предназначены для электронной микроскопии, их следует завернуть во влажную тонкую бумагу. Любое длительное хранение пораженных тканей должно происходить при -70°C или ниже для того чтобы свести к минимуму потерю титров вируса. Следует избегать повторного замораживания и размораживания, так как это снижает инфекционность вируса.

Экссудат и эпителиальные клетки соскабливают с трахей, разводят приблизительно 1:5 в питательном бульоне, содержащем пенициллин и стрептомицин, и энергично взбалтывают. Полученную суспензию центрифугируют при низкой скорости для удаления дебриса, и 0,1 мл надосадочной жидкости вводят в отслоившуюся хорион-аллантоисную оболочку как минимум трех оплодотворенных куриных яиц, которые инкубировали в течение 10-12 дней. Яйца покрывают парафином и инкубируют при 37°C до 7 дней. Их просвечивают каждый день, и хорион-аллантоисную оболочку погибших эмбрионов или эмбрионов, выживших в течение 7 дней, исследуют на типичные вирусные поражения.

Возможен альтернативный вариант: как минимум два сливающихся монослоя клеток печени куриных эмбрионов или клеток почек куриных эмбрионов, после удаления среды, заражают и оставляют для впитывания на 1-2 часа. Культуры покрывают свежей средой, инкубируют до 7 дней и проверяют ежедневно под микроскопом на наличие признаков типичного синцитиального цитопатогенного эффекта (ЦПЭ).

В каждом конкретном случае может понадобиться до трех пассажей материала, прежде чем образец будет считаться отрицательным. Изолят вируса можно подтвердить как вирус ИЛТ при помощи реакции нейтрализации в яйцах или клеточной культуре с использованием гипериммунной антисыворотки к вирусу ИЛТ. Кроме того, вирусные частицы можно быстро идентифицировать в культуральной жидкости или в вирусных поражениях на хорион-аллантаоисных оболочках при помощи электронной микроскопии, вирусные антигены – при помощи иммунофлюоресценции в зараженных вирусом ИЛТ клеточных культурах, залитых ацетоном, или в замороженных срезах хорион-аллантаоисной оболочки, и нуклеиновые кислоты вируса - при помощи ПЦР.

1.2. Иммунофлюоресценция

В реакции иммунофлюоресценции для обнаружения вирусных антигенов, соскобы эпителиальных клеток из трахеи размазывают на предметном стекле. Кроме того, можно использовать криостатные срезы трахеи толщиной 5 мкм, мгновенно замороженные в жидком азоте. Препараты фиксируют в ацетоне при комнатной температуре в течение 10 минут. Их можно окрашивать непосредственно с использованием куриного иммуноглобулина против вируса ИЛТ, меченого флуоресцинизиотиоцианатом (FITC) в течение 1 часа с последующим промыванием в течение 15 минут в ванне с фосфатно-буферным раствором, рН 7,2, и перемешивают магнитной мешалкой. В иных случаях можно провести их не прямое окрашивание с использованием подходящего разведения куриной сыворотки против ИЛТ в течение 1 часа. Предметное стекло тщательно промывают фосфатно-буферным раствором в течение 15 минут как описано выше, и антикуриный иммуноглобулин, меченый флуоресцинизиотиоцианатом, наносят на 30 минут. После последнего промывания покровные стекла помещают на невыцветающую гистологическую среду. Препараты исследуют на специфичную внутриядерную флюоресценцию в эпителиальных клетках с использованием микроскопа с эпифлуоресцентным ультрафиолетовым светом. Подходящие контроли – это известные незараженные образцы, а для непрямого метода – неиммунизированная куриная сыворотка. Следует соблюдать особую осторожность при анализе препаратов при не прямой иммунофлюоресценции, так как эндогенный куриный IgG в трахее может вызывать нежелательное связывание антикуриного IgG, меченого флуоресцинизиотиоцианатом.

1.3. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)

Ряд наборов ИФА коммерчески доступны, и процедура анализа может изменяться в зависимости от набора; необходимо всегда следовать инструкциям производителя.

Когда ИФА с моноклональными антителами используется для выявления вирусных антигенов (McNulty et al., 1985), трахеальный экссудат смешивают с равным объемом фосфатно-буферного солевого раствора, содержащего 1% (объем к объему) детергента, такого как Нонидет Р40 (BDH Chemicals, г.Пул, Соединенное Королевство), затем перемешивают на вортексе в течение 30 секунд и центрифугируют при 10 g в течение 1

минуты. Надосадочную жидкость закапывают в количестве 50 мкл в лунки титрационных микропланшетов, на которые предварительно нанесли кроличий IgG против вируса ИЛТ, разводят 1:200 в 0,05 М карбонатного/бикарбонатного буфера, рН 9,0, и инкубируют в течение 1 часа. Затем 50 мкл моноклональных антител против основных гликопротеинов вируса ИЛТ, разведенных 1:50 в фосфатно-буферном солевом растворе, добавляют в каждую лунку, затем 50 мкл (разведение 1:1000) афинно-очищенного козьего антимышиного IgG конъюгируют с пероксидазой хрена. Субстрат 5-аминосалициловой кислоты (6,5 мМ) добавляют в лунки в объемах 100 мкл. Через 30 минут планшеты считывают при 450 нм при использовании спектрофотометра, и показание абсорбции для каждой лунки корректируется путем вычитания показаний, полученных для лунок, содержащих разбавляющий буфер вместо трахеального экссудата. Положительная/отрицательная пороговая точка разделения берется как среднее значение абсорбции для нескольких отрицательных (например, материал трахеи без вируса ИЛТ) образцов плюс 3 средних квадратических отклонения.

1.4. Гистопатология

Птицы, отобранные для вскрытия, должны находиться в острой фазе болезни. Эвтаназия должна осуществляться с помощью внутривенной инъекции барбитурата или воздействием галотана, чтобы избежать повреждения трахеи. Трахеи для гистологического исследования следует поместить в 10% нейтральный забуференный формалин или фиксатор Боуина (предпочтителен для выявления внутриядерных телец-включений) сразу после извлечения из птиц, и, после фиксации залить парафином. Иногда исследуют веки и легкие. Внутриядерные включения можно увидеть в эпителиальных клетках трахеи после окрашивания гематоксилином и эозином. Синцитиальные клеточные образования часто присутствуют в экссудате и обычно содержат внутриядерные тельца-включения. Они являются классическими включениями Коудри типа А герпесвирусов, но они могут присутствовать только в течение 3-5 дней после заражения. В случаях тяжелой болезни, когда большинство зараженных клеток отслоилось от слизистой оболочки трахеи, включения можно увидеть в интактных клетках среди продуктов распада клеток в просвете трахеи. Продольные срезы трахеи по сравнению с поперечными срезами позволяют провести исследование всей длины органа.

1.5. Молекулярные методы

Сообщалось о нескольких молекулярных методах для идентификации ДНК вируса ИЛТ в клинических образцах, но ПЦР оказалась самой полезной. Дот-блот гибридизация и клонированные фрагменты вирусной ДНК оказались высоко чувствительными для выявления вируса, если выделение вируса и ИФА дали отрицательный результат (Keam et al., 1991; Key et al., 1994). Numberd с соавторами (2002), используя гнездовую ПЦР, продемонстрировали, что ДНК вируса ИЛТ можно обнаружить в зафиксированных в формалине и залитых парафином тканях независимо от наличия синцитиальных клеток, внутриядерных включений или их обоих.

ПЦР оказалась более чувствительной, чем выделение вируса для клинических образцов, особенно когда присутствуют другие контаминантные вирусы, такие как аденовирусы (Williams et al., 1994). Alexander & Nagy (1997) обнаружили, что с середины до конца инфекционной стадии ПЦР и выделение вируса имели схожую чувствительность, но ПЦР показывала лучшие результаты в стадии выздоровления.

Сочетание анализа ПЦР с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) одного и многочисленных вирусных генов и геномных областей позволило охарактеризовать различные штаммы в стране или регионе (Chang et. al., 1997). В нескольких отчетах указывалось на то, что так как некоторые полевые штаммы являются близкородственными с и вероятно происходят от вакцинных вирусов, остальные являются действительно штаммами «дикого типа» (Ojčić et. al., 2006). Гены, повсеместно исследованные различными зарубежными авторами, включают ICP4, ТК (тимидинкиназа), гликопротеин G (gG), гликопротеин E (gE) и UL47. Oldoni & Garcia (2007) использовали 36 рестриктазы, в то время как другие использовали четыре. В настоящее время еще не существует универсально признанных молекулярных тестов, которые бы позволяли осуществлять дифференциацию между полевыми и вакцинными штаммами. Положительная история вакцинации в стаде может помочь интерпретации результатов, хотя следует учитывать, что инфекция, вызванная полевым штаммом, может возникнуть у вакцинированных птиц. Вакцинные штаммы также иногда могут быть выделены из невакцинированных птиц.

1.5.1. Процедуры тестирования

і) Традиционная ПЦР

В типичном протоколе ПЦР в отношении вируса ИЛТ, вирусную ДНК получают из клинических образцов (мазки, кусочки тканей), бляшек хорион-аллантаисных оболочек, надосадочной жидкости клеточной культуры или вакцин с использованием наборов для экстрагирования ДНК. Используемые праймеры можно получить, как описано в ранее опубликованной работе, или составить с использованием последовательностей вируса ИЛТ из международной базы данных Genbank.

Следующий протокол рутинно используют в ряде ветеринарных диагностических лабораторий для выявления вируса ИЛТ в клинических образцах, он обладает потенциалом для предварительного типирования вируса с помощью полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ампликонов ПЦР. Вся информация по ПЦР представлена в работе Kirkpatrick с соавторами (2006b). Вкратце, участок длиной 2,24 т.п.н. гена тимидинкиназы вируса ИЛТ амплифицируется с использованием пары прямого (5'-CTG-GGC-TAA-ATC-ATC-CAA-GAC-ATC-A-3') и обратного (5'-GCT-CTC-TCG-AGT-AAG-AAT-GAG-TAC-A-3') праймера, а полученные ампликоны отделяют с помощью электрофореза в 0,8% агарозном геле, окрашивают подходящим красителем для нуклеиновых кислот и подвергают ультрафиолетовому излучению для визуализации. В 50 мкл амплификационной реакции содержится 200 мкм каждого dATP, dCTP, dGTP и dTTP; 1 mM MgCl₂, 250 мкм каждого праймера, 1 мкл (2,5 единицы) Taq ДНК-полимеразы, 5 мкл буфера 10 × Taq ДНК-полимеразы и 5 мкл экстрагированной ДНК в качестве матрицы. Реакционная смесь инкубируется в течение 3 минут при температуре 94°C, затем подвергается 35 циклам в течение 15 секунд при температуре 94°C, в течение 45 секунд при 60°C и в течение 150 секунд при 72°C и в итоге инкубируется в течение 3 минут при температуре 72°C. В каждой серии ПЦР, контрольная пробирка, содержащая стерильную дистиллированную H₂O, вместо экстрагированной ДНК, должна входить в состав отрицательного контроля.

Другой протокол, который использовался в ветеринарных диагностических лабораториях по всему миру для выявления и предварительного типирования вируса, включает амплификацию двух участков гена ICP4. Праймеры ICP4-1F(5'-ACT-GAT-AGC-TTT-

TCG-TAC-AGC-ACG-3') и ICP4-1R (5'-CAT-CGG-GAC-ATT-CTC-CAG-GTA-GCA-3') амплифицируют фрагменты длиной 688 пар оснований в позиции с 181 по 869²; ICP4-2F (5'-СТТ-СAG-АСТ-ССА-ГСТ-САТ-СТГ-3') и ICP4-2R (5'-AGT-CAT-GCG-TCT-ATG-GCG-TTG-AC-3') амплифицируют фрагмент длиной 635 пар оснований в позиции 3804 по 4440³. Вся информация по данным ПЦР предоставлена в работе Chacon & Ferreira (2009).

Протокол ПЦР в реальном времени, описанный Mahmoudian с соавторами (2011), также может использоваться как традиционный анализ ПЦР, а конечные продукты можно исследовать электрофорезом в 2% агарозном геле.

ii) ПЦР в режиме реального времени

ПЦР в режиме реального времени была описана для вируса ИЛТ (Creelan et. al., 2006; Mahmoudian et. al., 2011). Ее преимущество состоит в том, что ее можно провести менее чем за 2 часа. Таким образом, она является очень быстрым методом диагностики ИЛТ по сравнению с традиционным выделением вируса или даже со стандартной ПЦР с последующим гель-электрофорезом. Следующий протокол может быть использован для быстрого выявления вируса ИЛТ в клинических образцах. Вся информация о методе представлена в работе Callison с соавторами, (2007). Вкратце, два олигонуклеотидных праймера, ILTVgCU771 (5'-CCT-TGC-GTT-TGA-ATT-TTT-CTG-T-3') и ILTVgCL873 (5'-TTC-GTG-GGT-TAG-AGG-TCT-GT-3') используются для амплификации продукта длиной 103 пар оснований из гена ILTV gC. Также используется зонд Taqman с двойной меткой, ILTV зонд817 (5'-FAM-CAG-CTC-GGT-GAC-CCC-ATT-СТА-ВНQ1-3'). Реакция проводится при помощи подходящих наборов ПЦР, например, с использованием 25 мкл общего объема, содержащего 10 мкл 2× мастер-микс, 0,5 мкм прямого и обратного праймеров, 0,1 мкм зонда, 1 мкл НК-UNG, и 5 мкл ДНК-матрицы. Инкубирование и получение данных осуществляется с использованием термоциклера в реальном времени, хотя протоколы ПЦР нужно будет оптимизировать для используемого прибора. Реакционную смесь инкубируют в течение 2 минут при температуре 50°C, 15 минут при температуре 95°C, затем 40 циклов по 15 секунд при температуре 94°C и минуту при температуре 60°C. Для каждого анализа, число пороговых циклов является числом циклов ПЦР, при котором флуоресценция реакции превышает 30 единиц флуоресценции.

iii) Анализ нуклеотидной последовательности

Некоторые гены вируса ИЛТ могут быть мишенями для ПЦР, с последующим анализом нуклеотидной последовательности результирующих ампликонов с целью идентификации штамма. Например, ICP4 может быть амплифицирован с помощью ПЦР, с использованием праймеров, описанных Chacon & Ferreira (2009), и результирующих ампликонов, очищенных с использованием метода мини колонок, и представленных для двунаправленного ДНК-секвенирования, с использованием ПЦР-праймеров в качестве праймеров для секвенирования. Для анализа последовательностей и сравнения с существующими последовательностями в GenBank можно использовать различные компьютерные программы, включая clustal W. Необходимо отметить, что для надлежащей идентификации штаммов вируса ИЛТ может понадобиться анализ последовательности многочисленных генов.

² номер доступа Genbank NC 006623

³ номер доступа Genbank NC 006623

iv) *Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ)*

Был описан ряд рестрикционных эндонуклеаз (RE) для ПДРФ-анализа ПЦР-продуктов вируса ИЛТ, и несколько генов были мишенями для расщепления. К ним относятся: ICP4, ТК, UL15, UL47 гликопротеин G, и ORF-ВТК гены. Подробное описание методологии можно найти в работе Creelan с соавторами (2006), Han & Sim (2001), Kirkpatrick с соавторами (2006а), Ojkić с соавторами (2006) и Oldoni & Garcia (2007). Краткое описание методологии для ТК, ICP4, ICP18.5 и ORFB-ТК с использованием ПЦР ПДРФ приведено ниже из работы Kirkpatrick с соавторами (2006а) с некоторыми изменениями.

Для амплификации ТК, ПЦР проводят в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 200 мкм каждого dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 1 mM MgCl₂, 250 мкм каждого праймера (прямой ТК: CTG-GGC-TAA-ATC-ATC-CAA-GAC-ATC-A; и обратный ТК: GCT-CTC-TCG-AGT-AAG-AAT-GAG-TAC-A), 1,25 единицы Taq ДНК-полимеразы (Promega), 5 мкл 10 × буфер Taq ДНК-полимеразы и 2 мкл экстрагированной ДНК. Реакционную смесь инкубируют в течение 3 минут при температуре 94°C, затем подвергают 35 циклам в течение 15 секунд при температуре 94°C, в течение 45 секунд при 60°C и в течение 60 секунд при 72°C и в итоге инкубируют в течение 3 минут при температуре 72°C.

ПЦР-амплификация ICP4, ICP18.5 и ORFB-ТК проводится в отдельных пробирках, с использованием следующих праймеров: прямой ICP4: AAA-CCT-GTA-GAG-ACA-GTA-CCG-TGA-C и обратный ICP4: ATT-ACT-ACG-TGA-CCT-ACA-TTG-AGC-C; прямой ICP18.5: TCG-CTT-GCA-AGG-TCT-TCT-GAT-GG и обратный ICP18.5: AGA-AGA-TGT-TAA-TTC-ACA-CGG-ACA-C; прямой ORFB-ТК: TCT-GCG-ATC-TTC-GCA-GTG-GTC-AG и обратный ORFB-ТК: TGA-CGA-GGA-GAG-CGA-ACT-TTA-ATC-C. 50 мкл реакционной смеси содержит 200 мкм каждого dATP, dCTP, dGTP и dTTP, 2 mM MgSO₄, 250 мкм каждого праймера, 1 единицу Platinum Taq ДНК-полимеразы с высокой точностью (Invitrogen), 5 мкл 10 × буфер Platinum Taq ДНК-полимеразы и 2 мкл экстрагированной ДНК. Реакционную смесь инкубируют в течение 1 минуты при 94°C, затем подвергают 35 циклам в течение 1 минуты при 94°C, в течение 7 минут при температуре 68°C, и наконец инкубируют в течение 10 минут при температуре 68°C.

ПЦР-продукты ТК, ICP4, ICP18.5 и ORFB-ТК объемом по 10 мкл расщепляются отдельно при помощи рестрикционных эндонуклеаз MspI, HaeIII, HaeIII и FokI соответственно, при температуре 37°C в течение 1 часа. После расщепления, полученные фрагменты ДНК разделяют в 15% полиакриламидном геле, и рестрикционные фрагменты ДНК визуализируют с использованием подходящего красителя нуклеиновых кислот и подвергают ультрафиолетовому излучению для визуализации. Разницы в паттерне записывают для каждого фермента и результаты можно оформить в виде древовидных схем. Сочетание ПЦР и ПДРФ позволило отличать полевые штаммы вируса ИЛТ от вакцинных штаммов (Creelan et. al., 2006; Han & Sim 2001; Kirkpatrick et. al., 2006а; Ojkić et. al., 2006; Oldoni & Garcia 2007).

2. Серологические тесты

Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) является предпочтительным методом для выявления антител к вирусу ИЛТ в куриной сыворотке. Также можно использовать реакцию нейтрализации вируса (Adair et.al., 1985). В настоящее время иммунодиффузия в агаровом геле (AGID) и непрямая реакция иммунофлюоресценции мало используются.

2.1. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)

Ряд наборов ИФА имеются в продаже, и процедура анализа может изменяться в зависимости от набора; необходимо всегда следовать инструкциям производителя. Антиген для ИФА получают посредством разрушения ультразвуком сильно зараженных культур клеток в момент максимального цитопатогенного эффекта, затем его центрифугируют и супернатант абсорбируют на лунках титрационных микропланшетов. Отрицательный антиген получают при помощи обработки незараженного материала культуры клеток аналогичным образом. Реакция состоит главным образом в добавлении 0,1 мл тест-сыворотки в разведении 1/10 для дублирования лунок, покрытых положительным или отрицательным антигеном. После инкубирования при 37°C в течение 2 часов планшеты промывают 4 раза и добавляют кроличий антикуриный иммуноглобулин G, конъюгированный пероксидазой хрена при разведении 1:4000. После инкубирования при 37°C в течение 1 часа, планшеты снова промывают 4 раза. В конце в каждую лунку добавляют субстрат, состоящий из 5-аминосалициловой кислоты с последующим добавлением перекиси водорода до конечной концентрации 0,0005%, и абсорбцию жидкости в каждой лунке считывают при 450 нм на спектрофотометре. Результат для каждой сыворотки выражают в виде разницы между средней абсорбцией, полученной с положительными и отрицательными антигенами. Положительная/отрицательная пороговая точка разделения берется как среднее значение абсорбции для многочисленных отрицательных сывороток плюс 3 средних квадратических отклонения. Данная реакция является очень чувствительной и возможно наилучшей имеющейся для надзора. Гуморальный иммунный ответ согласно измерениям ИФА можно выявить на 7-10 день после заражения, и он достигает пика приблизительно через 2 недели. Реакция на вакцины ИЛТ может быть изменчивой и тестирование нецелесообразно проводить ранее, чем через 14 дней после вакцинации.

2.2. Реакция нейтрализации вируса

Реакцию нейтрализации вируса можно проводить на отслоившихся хорион-аллантаоисных оболочках оплодотворенных куриных яиц, которые инкубировали в течение 9-11 дней, где антитела специфически нейтрализуют образование вирусных поражений, обусловленных вирусом ИЛТ. Кроме того, реакции можно проводить в клеточных культурах, где антитела специфически нейтрализуют вирус ИЛТ, таким образом, предотвращая развитие цитопатогенного эффекта. Двойные разведения сыворотки добавляют к одинаковым объемам постоянной концентрации вируса. Эта концентрация может составлять либо 100 средних инфицирующих доз яиц (EID₅₀) для заражения яиц, либо 100 средних инфекционных доз в тканевой культуре (ТЦД₅₀) для заражения культур. Смеси инкубируют при 37°C в течение 1 часа для того чтобы произошла нейтрализация.

Когда проводится реакция на яйцах, смеси вируса/сыворотки вводят в отслоившиеся хорион-аллантаоисные оболочки с использованием как минимум пяти яиц на разведение. Яйца запечатывают и инкубируют при 37°C в течение 6-7 дней. Конечная точка регистрируется, как самое сильное разведение сыворотки, когда не имеется вирусных поражений на хорион-аллантаоисных оболочках. Когда реакции проводятся на клеточных культурах, разведения сыворотки готовятся в 96-луночных планшетах для микрокультуры, и затем добавляется вирус. После периода времени, отведенного для нейтрализации, в каждую лунку добавляют свежеприготовленные клетки печени или почек куриного эмбриона. Планшеты инкубируют при 37°C в среде 5% CO₂ и исследуют ежедневно на наличие цитопатогенного эффекта; 50% конечных точек считывают приблизительно через 4 дня когда контрольный титр вируса указывает, что в реакции использовались ТЦД₅₀ вируса, равные 30-300. Для метода тестирования при помощи

культуры клеток положительной считается нейтрализация вируса при 1/8 (начальное разведение) или выше.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Краткая информация

Борьба с ИЛТ обычно осуществляется при помощи живых вакцин. Вакцины могут использоваться в случае вспышек заболевания, или могут рутинно использоваться в эндемичных районах. Могут потребоваться повторные дозы для обеспечения хорошей защиты. В большинстве случаев используются живые аттенуированные вакцины против ИЛТ, изготовленные в клеточных культурах или оплодотворенных куриных яйцах. В последние годы живые рекомбинантные (векторные) вакцины производили с использованием герпесвируса индеек или вируса оспы кур для экспрессии гликопротеинов вируса ИЛТ. Недавно проводились исследования, касающиеся генно-инженерных вакцин на основе делеционных мутантов, и результаты первых исследований кажутся обнадеживающими (Corro et. al., 2013). Для аттенуированных вакцин против ИЛТ, живой вирусный посевной материал представляет собой надлежащим образом аттенуированный или естественно авирулентный штамм вируса ИЛТ. Живые аттенуированные вакцины против ИЛТ можно вводить закапыванием в глаза, разбрызгиванием или с питьевой водой. Рекомбинантные вакцины можно вводить методом прокола перепонки крыла, при помощи подкожной инъекции или методом *in-ovo*. Существует ряд преимуществ и недостатков, связанных с каждым типом вакцины и различными методами ее введения (Corro et. al., 2013). Например, векторные вакцины могут давать лишь частичную защиту, а живые аттенуированные вакцины против ИЛТ могут иметь остаточную вирулентность, которая может вызвать клиническое заболевание, особенно если вакцина вводится разбрызгиванием и получают мелкие капли, которые вдыхаются. Живые аттенуированные вакцины против ИЛТ также могут вернуться к более высокому уровню вирулентности после распространения от птицы к птице, и они могут персистировать в поле (Corro et. al., 2013). В связи с этим может быть трудно приостановить вакцинацию после того как она началась. Субклинические смешанные инфекции вакцинного и полевого вируса у вакцинированных птиц могут вызвать тяжелое заболевание у невакцинированных контактирующих птиц. Сообщалось о том, что естественная рекомбинация между аттенуированными вакцинными штаммами вируса ИЛТ приводит к получению вирулентных вирусов, а это также представляет опасность при использовании других живых вакцин. Таким образом, следует избегать использования многочисленных различных вакцин против вируса ИЛТ в одних и тех же популяциях (Corro et. al., 2013).

Руководство по производству ветеринарных вакцин дано в Главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Нормы, указанные здесь и в Главе 1.1.8, даны как общие сведения и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями (например, см. Свод федеральных постановлений Соединенных Штатов Америки, 2000; Европейская фармакопея, 2010).

2. Общие сведения о производстве и минимальных требованиях к вакцинам

2.1. Характеристики посевного материала

2.1.1. Биологические характеристики исходного вакцинного вируса

Для аттенуированных живых вакцин против ИЛТ, вирусный посевной материал представляет собой надлежащим образом аттенуированный или естественно авирулентный штамм вируса ИЛТ. Аттенуация достигается при помощи серийного пассажа вируса в оплодотворенных яйцах или культурах тканей. Рекомбинантные векторные вакцины производят с использованием методологии рекомбинантных ДНК. Исходный вакцинный вирус (MSV) могут размножать в СПФ куриных эмбрионах или культурах тканей, полученных от данных эмбрионов. Проводятся предварительные испытания для демонстрации безопасности и эффективности выбранного исходного вакцинного вируса. Также исходный вакцинный вирус должен тестироваться на чистоту, идентичность вируса и на наличие посторонних патогенов. Исходный вакцинный вирус хранят в аликвотах при -70°C . Вирусы, используемые при производстве, должны пройти не более 5 пассажей от исходного вакцинного вируса.

2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, свобода от посторонних патогенов)

Следует регистрировать информацию о происхождении вирусного посевного материала, включая историю пассирования и любые манипуляции с генами. Исходный вакцинный вирус тестируют в куриных эмбрионах или курах на стерильность и свободу от посторонних веществ (см. раздел 1.1.9). Содержание вируса определяют при помощи титрования вируса в куриных эмбрионах или культуре клеток.

2.1.3. Валидация в качестве вакцинного штамма

Вакцины против ИЛТ обеспечивают перекрестную защиту против различных штаммов вируса ИЛТ. Заражение нецелевых видов вакцинными штаммами вируса ИЛТ не является серьезной проблемой в связи с узким кругом хозяев вируса ИЛТ.

2. Метод производства

2.2.1. Процедура

При массовом производстве вакцины, вирус размножают в СПФ куриных эмбрионах или культуре тканей, полученной от данных эмбрионов, не более чем в 5 пассажах от исходного вакцинного вируса. Подходящий уровень пассирования поддерживается экспериментально с использованием уровня пассирования, который применялся для приготовления экспериментального продукта, используемого в исследовании эффективности. Вакцину готовят путем введения производственного вакцинного вируса в 9-11 дневные куриные эмбрионы или культуру тканей, приготовленную из куриных эмбрионов, полученных из СПФ-стад. Яйца заражают через отверстие в скорлупе, в отслоившуюся хорион-аллантоисную оболочку или в аллантоисный мешок. Их запечатывают и инкубируют при 37°C в течение 4-6 дней. Все яйца проверяют просвечиванием до сбора вируса, и используют только яйца с живыми эмбрионами. Для сбора вируса яйца охлаждают, затем очищают и вскрывают в стерильных условиях. Хорион-аллантоисные оболочки или аллантоисные жидкости объединяют в пулы в стерильных охлажденных контейнерах. На хорион-аллантоисных оболочках должны иметься плотные серые бляшки, характерные для роста вируса ИЛТ. Продукт, полученный из культуры ткани, будет приготовлен из культуральной жидкости, содержащей вирус, которую впоследствии также объединят в пулы и протестируют.

2.2.2. Требования к ингредиентам

Сыворотка КРС, используемая при производстве вакцины, должна поставляться из страны с незначительным риском по трансмиссивной губкообразной энцефалопатии (ТГЭ). Следует учитывать происхождение панкреатического трипсина животного происхождения, используемого для культур клеток. Смотрите Главу 1.1.8, в которой уделяется особое внимание продуктам биологического происхождения из страны с незначительным риском по ТГЭ.

2.2.3. Технологический контроль

Гомогенат зараженной ткани или тканевой культуры можно протестировать на чистоту, иммуногенность, содержание вируса и безопасность.

2.2.4. Испытания партий готовой продукции

i) Стерильность

Тесты на стерильность и отсутствие контаминации биоматериалов можно найти в Главе 1.1.9.

ii) Идентичность

Наличие вируса ИЛТ можно подтвердить при помощи смешивания вакцины с антисывороткой к вирусу ИЛТ и демонстрации того, что он более не способен инфицировать оплодотворенные куриные яйца от СПФ-стада, или восприимчивые линии клеток, которые инокулируют данным вирусом.

iii) Безопасность

Каждая партия вакцины вводится закапыванием в глаза (десять доз на птицу) или интратрахеально СПФ-курам или другим целевым видам. Птиц обследуют в течение 14-21 дня на предмет побочных действий вакцины.

iv) Иммуногенность партии

Как только эффективность вакцины *in vivo* установлена, можно определить иммуногенность партии при помощи измерения содержания вируса. Это осуществляется при помощи титрования вируса с использованием серийных разведений вакцины, которые вводят в отслоившуюся хорион-аллантаисную оболочку оплодотворенных куриных яиц, или при помощи инокуляции подходящих клеточных культур. Содержание вируса (проверяемое в любое время периода истечения срока действия) должно быть равно или выше минимального титра, указанного на этикетке. Титры при выпуске и титры по истечению срока действия основаны на минимальной защитной дозе вакцины. Хотя тестирование эффективности каждой партии вакцины может и не понадобиться, может потребоваться тестирование эффективности репрезентативной партии (с использованием вакцинирующей дозы, содержащей титр, не превышающий минимального титра вируса, указанного на этикетке).

2.3. Требования к разрешению/регистрации/лицензированию

2.3.1. Процесс производства

Для регистрации вакцины органам власти должны быть представлены все соответствующие данные, касающиеся производства вакцины и тестирования контроля качества (См. Разделы С.2.1 и С.2.2). Данная информация должна быть представлена на основании трех следующих друг за другом партий вакцины объемом не менее 1/3 от обычного объема промышленной партии.

2.3.2. Требования к безопасности

В США 25 восприимчивым курам (в возрасте 3-4 недель) препарат вводят интратрахеально и их наблюдают в течение 14 дней. Смертельные случаи считают как отрицательный результат. Для признания серии удовлетворительной разрешается получить четыре или менее отрицательных результата. В Европейском Союзе для предварительных тестов на безопасность используется вакцинный вирус минимального уровня пассирования для аттенуации между исходным вакцинным вирусом и партией вакцины. 20 СПФ кур заражают дозой, превышающей в 10 раз вакцинную дозу, и их наблюдают в течение 21 дня. Каждый способ и метод введения, рекомендованный для вакцинации, должен тестироваться на курах самого молодого возраста, рекомендованного для вакцинации. Не допускается наличия характерных клинических признаков или смертельных случаев, вызванных ИЛТ. В ЕС тестирование партии на безопасность требует заражения 10 СПФ-кур самого молодого возраста, рекомендованного для вакцинации, десятикратной дозой вакцины путем закапывания в глаза. Кур наблюдают в течение 21 дня. Не допускается наличия характерных клинических признаков или смертельных случаев, вызванных ИЛТ.

i) Возврат к вирулентности

ЕС требует проведения пяти последовательных пассажей вакцинного вируса *in vivo*. Каждый пассаж проводят на группах из пяти СПФ-кур. Последовательный пассаж можно осуществить при помощи естественного распространения или при помощи отбора и объединения в пулы инфекционного материала из респираторного тракта от одной группы птиц и использования данного материала для заражения последующей группы птиц закапыванием в глаза. Пассированный вирус, полученный после пяти последовательных пассажей (или ранее если пассаж не получается поддерживать), сравнивают с непассированным вирусом с использованием индекса респираторной вирулентности. Максимально пассированный вирус не должен демонстрировать повышения вирулентности. Исследование индекса респираторной вирулентности включает интратрахеальное заражение 0,2 мл вакцины в трех различных дозах, начиная с исходной культуры с титром 10^5 инфицирующей дозы яиц или (EID₅₀) или 10^5 средней инфекционной дозы для клеточной культуры (CCID₅₀) на 0,2 мл (или максимальный полученный титр), и затем двумя серийными десятикратными разведениями данной исходной культуры. Как минимум 20 СПФ-кур было заражено одной дозой на каждую птицу. За курами ведется наблюдение в течение 10 дней, смертельные случаи регистрируются. Индекс респираторной вирулентности - это общее количество случаев гибели в трех группах, деленное на общее количество кур.

ii) Меры предосторожности (риски)

Следует соблюдать осторожность при разведении и введении вакцины и при правильной утилизации неиспользованной вакцины.

2.3.3. Требования к эффективности вакцины

Следует провести тестирование для установления эффективности вакцины для групп птиц минимального возраста, для которых предназначен препарат, а также для каждого вида птиц. Должен тестироваться каждый способ и метод введения, рекомендованный для вакцинации. Двадцать (США) или 30 (ЕС) кур вакцинируют вакцинным вирусом максимального уровня пассирования для аттенуации. Десять дополнительных кур содержат в качестве контролей.

Спустя 10-14 дней (США) или 21 день (ЕС) вакцинированных кур вместе с контрольными птицами подвергают контрольному заражению интратрахеально или в глазной синус вирулентным вирусом ИЛТ. Как минимум 80% (США) или 90% (ЕС) невакцинированных контрольных птиц должны умереть, или иметь тяжелые клинические признаки ИЛТ, или демонстрировать значительные макроскопические поражения. Удовлетворительным считается результат, когда только 5% или 10% вакцинированных птиц погибают или имеют тяжелые клинические признаки ИЛТ, или демонстрируют значительные макроскопические поражения.

2.3.4. Вакцины, позволяющие использовать стратегию DIVA (выявление инфекции у вакцинированных животных)

Изобретение рекомбинантных (векторных) вакцин против ИЛТ позволило осуществлять серологическую дифференциацию инфицированных и вакцинированных птиц и позволило использовать контрольную стратегию DIVA. Многие вакцины против ИЛТ с делецией гена, которые находятся в процессе разработки, дают такие же возможности. В нескольких исследованиях сообщалось об использовании серологических методов скрининга для выявления антител против специфичных гликопротеинов вируса ИЛТ (Сорро и др., 2013).

2.3.5. Продолжительность иммунитета

Результаты вакцинации будут зависеть от многих факторов, включая режим дозирования и способ введения. Должна обеспечиваться некоторая степень защиты на протяжении нескольких месяцев.

2.3.6. Стабильность

Стабильность проверяют посредством регулярного отбора образцов правильно хранившейся вакцины и измерения содержания вируса. Тесты должны проводиться как минимум на шести партиях вакцины или до тех пор, пока не будет оценено статистически допустимое количество серий, и должны продолжаться в течение 3 месяцев после установленного срока годности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ADAIR B.M., TODD D., MCKILLOP E.R. & BURNS K. (1985). Comparison of serological tests for the detection of antibodies to infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathol.*, 14, 461–469.

ALEXANDER H.S. & NAGY E. (1997). Polymerase chain reaction to detect infectious laryngotracheitis virus in conjunctival swabs from experimentally infected chickens. *Avian Dis.*, 41, 646–653.

ARMSTRONG W.H. (1959). A slide smear technique for the diagnosis of laryngotracheitis. *Avian Dis.*, 3, 80–84.

BRAUNE M.O. & GENTRY R.F. (1985). Standardization of the fluorescent antibody technique for the detection of avian respiratory viruses. *Avian Dis.*, 9, 535–545.

CALLISON S.A., RIBLET S.M., OLDONI I., SUN S., ZAVALA G., WILLIAMS S., RESURRECCION R.S., SPACKMAN E. & GARCIA M. (2007). Development and validation of a real-time Taqman® PCR assay for the detection and quantitation of infectious laryngotracheitis virus in poultry. *J. Virol. Methods*, 139, 31–38.

CHACON J.L. & A. J.FERREIRA (2009). Differentiation of field isolates and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus by DNA sequencing. *Vaccine*, 27, 6731–6738.

CHANG P.C., LEE Y.L., SHIEN J.H. & SHIEH H.K. (1997). Rapid differentiation of vaccine strains and field isolates of infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism of PCR products. *J. Virol. Methods*, 66, 179–186.

CHANG P.W., YATES V.J., DARDIRI A.H. & FRY D.E. (1960). Some observations of the propagation of infectious laryngotracheitis virus in tissue culture. *Avian Dis.*, 4, 484–490.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS (OF THE UNITED STATES OF AMERICA) (CFR) (2000). Part 9, Section 113.328, Fowl Laryngotracheitis Vaccine. US Government Printing Office. Washington DC, USA.

COPPO M.J.C., NOORMOHAMMADI A.H., BROWNING G.F. & DEVLIN J.M. (2013). Challenges and recent advances in infectious laryngotracheitis virus vaccines. *Avian Pathol.*, 42, 195–205.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 6.0 (2010). Avian infectious laryngotracheitis vaccine (live) European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France, 872–873.

CREELAN J.L., CALVERT V.M., GRAHAM D.A. & MCCULLOCH J. (2006). Rapid detection and characterisation from field cases of infectious laryngotracheitis by real-time polymerase chain reaction and restriction fragment length. *Avian Pathol.*, 35, 173–179.

GUY J.S. & BAGUST T.J. (2003). Laryngotracheitis. In: Diseases of Poultry, Eleventh Edition, Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D., eds. Iowa State University Press, USA, 124–134.

HAN M.G. & SIM S.J. (2001). Analysis of Korean strains of infectious laryngotracheitis virus by nucleotide sequences and restriction fragment length polymorphism. *Vet. Microbiol.*, 83, 321–331.

HUGHES C.S. & JONES R.C. (1988). Comparison of methods of isolation of infectious laryngotracheitis from field material. *Avian Pathol.*, 17, 295–303.

HUGHES C.S., JONES R.C., GASKELL R.M., JORDAN F.T.W. & BRADBURY J.M. (1987). Demonstration in live chickens of the carrier state in infectious laryngotracheitis virus. *Res. Vet. Sci.*, 42, 407–410.

HUMBERD J., GARCIA M., RIBLET S.M., RESURECCION R.S. & BROWN T.P. (2002). Detection of infectious laryngotracheitis virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, 46, 64–74.

JORDAN F.T.W. (1964). Diagnosis of infectious laryngotracheitis by chick embryo inoculation. *J. Comp. Pathol.*, 74, 119–128.

KEAM L., YORK J.J., SHEPPARD M. & FAHEY K.J. (1991). Detection of infectious laryngotracheitis virus in chickens using a non-radioactive DNA probe. *Avian Dis.*, 35, 257–262.

KEY D.W., GOUGH B.C., DERBYSHIRE J.B. & NAGY E. (1994). Development and evaluation of a non-isotypically labeled DNA probe for the diagnosis of infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.*, 38, 467–474.

KIRKPATRICK N.C., MAHMOUDIAN A., COLSON C.A., DEVLIN J.M. & NOORMOHAMMADI A.H. (2006a). Relationship between mortality, clinical signs and tracheal pathology in infectious laryngotracheitis. *Avian Pathol.*, 35, 449–453.

KIRKPATRICK N.C., MAHMOUDIAN A., O’ROURKE D. & NOORMOHAMMADI A.H. (2006b). Differentiation of infectious laryngotracheitis virus isolates by restriction fragment length polymorphic analysis of polymerase chain reaction products amplified from multiple genes. *Avian Dis.*, 50, 28–34.

MAHMOUDIAN A., KIRKPATRICK N.C., COPPO M., LEE S.W., DEVLIN J.M., MARKHAM P.F., BROWNING G.F. & NOORMOHAMMADI A.H. (2011). Development of a SYBR green quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection and quantification of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathol.*, 3, 237–242.

MCNULTY M.S., ALLAN G.M. & MCCRACKEN R.M. (1985). Infectious laryngotracheitis in Ireland. *Irish Vet. J.*, 39, 124–125.

MEULEMANS G. & HALEN P. (1978). A comparison of three methods of diagnosis of infectious laryngotracheitis. *Avian Pathol.*, 7, 433–436.

OJKIC D., SWINTON J., VALLIERES M., MARTIN E., SHAPIRO J., SANEI B. & BINNINGTON B.(2006). Characterisation of field isolates of infectious laryngotracheitis virus from Ontario. *Avian Pathol.*, 35, 286–292.

OLDONI I. & GARCIA M. (2007). Characterisation of infectious laryngotracheitis virus isolates from the United States by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of multiple genome regions. *Avian Pathol.*, 36, 167–176.

PIROZOK R.P., HELMBOLDT C.F. & JUNGHERR E.L. (1957). A rapid histological technique for the diagnosis of avian infectious laryngotracheitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 130, 406–407.

SCHOLZ E., PORTER R.E. & GUO P.X. (1994). Differential diagnosis of infectious laryngotracheitis from other avian respiratory diseases by a simplified PCR procedure. *J. Virol. Methods*, 50, 313–321.

VAN KAMMEN A. & SPADBROW P.B. (1976). Rapid diagnosis of some avian virus diseases. *Avian Dis.*, 20, 748–751.

WILKS C.R. & KOGAN V.G. (1979). An immunofluorescence diagnostic test for avian infectious laryngotracheitis. *Aust. Vet. J.*, 55, 385–388.

WILLIAMS R.A., SAVAGE C.E. & JONES R.C. (1994). A comparison of direct electron microscopy, virus isolation and a DNA amplification method for the detection of avian infectious laryngotracheitis virus in field material. *Avian Pathol.*, 23, 709–720.

YORK J.J. & FAHEY K.J. (1988). Diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody ELISA. *Avian Pathol.*, 17, 173–182.