

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
«ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ
ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ВЕРЕЦУН АНДРІЙ ЛЕОНІДОВИЧ

УДК 619:616.98-036.22-078:578.825.1.083.33:636.5:602.3(477)

ДИСЕРТАЦІЯ

ЕПІЗООТОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ, БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ
ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ ТА УДОСКОНАЛЕННЯ СЕРОЛОГІЧНОЇ
ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЙНОГО ЛАРИНГОТРАХЕЇТУ

21 — Ветеринарія

211 — Ветеринарна медицина

Подається на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ А. Л. Верецун

Науковий керівник: **Музика Денис Васильович,**
доктор ветеринарних наук,
старший науковий співробітник

Харків — 2025

АНОТАЦІЯ

Верецун А. Л. Епізоотологічний моніторинг, біологічні властивості ізолятів вірусу та удосконалення серологічної діагностики інфекційного ларинготрахеїту. — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 — Ветеринарна медицина. — Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». Харків, 2025.

Дисертаційна робота виконана у відділі хвороб птиці та молекулярної діагностики Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» відповідно до завдань: 38.01.02.02. Ф «Встановити еко-географічні особливості збудників економічно значимих вірусних інфекційних захворювань (корона-, бірна-, герпес-, цирко-, покс- та параміксовірусної етіології) сільськогосподарської птиці в різних регіонах України» (номер державної реєстрації 0116U000230) та 34.01.01.07 П «Розроблення сучасної системи моніторингу, прогнозування, специфічної профілактики та контролю вірус-бактеріальних асоціацій у сільськогосподарської птиці в рамках концепції «Єдиного здоров'я» у зв'язку зі світовою глобалізацією та змінами клімату» (номер державної реєстрації 0121U108373).

На сьогодні одним з найактуальніших питань забезпечення епізоотичного благополуччя птахівництва є проблема вірусних інфекційних захворювань сільськогосподарської птиці. Інфекційний ларинготрахеїт відноситься до так званих «економічно значущих» інфекційних захворювань у країнах з розвиненим промисловим птахівництвом. Вірус інфекційного ларинготрахеїту не представляє небезпеки для здоров'я людини та не викликає у неї захворювання, але, у той же час, він є небезпечним для свійської птиці. Це захворювання є достатньо поширеним у світі та найбільш часто реєструється в країнах, де є велика частка промислових

птахівничих господарств. Особливістю цього захворювання є його перебіг в субклінічній, латентній, асоційованій формі на фоні вакцинації, що суттєво ускладнює діагностику та профілактику. Крім того, здатність вірусу до генетичних змін призводить до зміни патогенності, ускладнює його профілактику, тому відслідковування будь-яких змін у генетичній структурі вірусу, а відповідно і змін у патогенності циркулюючих штамів, має велике значення для подальшої профілактики та боротьби з цим захворюванням. Ще однією важливою особливістю є симптоматика інфекційного ларинготрахеїту. Це респіраторний вірус, який уражає дихальну систему, та його треба диференціювати від таких особливо небезпечних інфекцій як грип, ньюкаслська хвороба, бактеріальні інфекції, тож актуальним є вдосконалення лабораторної діагностики. У зв'язку з цим, дисертаційна робота присвячена епізоотологічному моніторингу та вивченню поширення вірусу інфекційного ларинготрахеїту курей у промислових та присадибних птахівничих господарствах різних регіонів України, виділенню збудника ІЛТ від хворих та загинувших курей, вивченню їх біологічних властивостей із диференціацією походження вірусів від вакцинних або польових, а також удосконаленню лабораторної серологічної діагностики інфекційного ларинготрахеїту в Україні. У роботі представлено комплексні результати польових та лабораторних досліджень, які були проведені в період 2017–2024 років, які включають серологічний моніторинг, вірусологічні, молекулярно-генетичні дослідження, патотипування збудника, його філогенетичний аналіз та вдосконалення лабораторної серологічної діагностики за рахунок розробки вітчизняної технології виготовлення ІФА тест-системи для виявлення специфічних антитіл до вірусу ІЛТ.

Наукова новизна результатів роботи полягає у комплексному епізоотологічному моніторингу інфекційного ларинготрахеїту курей у птахівничих господарствах різних типів (промислові та присадибні) у різних областях України в період 2010–2024 рр., який включав серологічні, вірусологічні та молекулярно-генетичні дослідження. Уперше в Україні

вивчено серопревалентність у невакцинованих та вакцинованих курей у птахівничих господарствах різних типів. Із патологічного матеріалу загиблих та хворих курей виділено нові ізоляти вірусу ІЛТ. Вивчено біологічні властивості українських ізолятів вірусу ІЛТ, виділених від птиці з промислових та присадибних птахівничих господарств (їх здатність викликати аглютинацію еритроцитів, здатність до репродукції в курячих ембріонах тощо). Відтворено захворювання в умовах лабораторії та визначено, які гістологічні зміни з'являються під впливом цього вірусу, а також оцінено наслідки цих змін. Уперше в Україні за результатами вірусологічних досліджень, а також подальших молекулярно-генетичних досліджень, установлено циркуляцію як вакциноподібних, так і польових ізолятів вірусу ІЛТ. Уперше проведено часткове секвенування геному вірусу ІЛТ, філогенетичний аналіз ізолятів, що циркулюють в Україні серед свійської птиці, та встановлено походження збудника. Уперше в Україні розроблено регламент отримання антигену вірусу ІЛТ для тест-системи ІФА для визначення специфічних антитіл до вірусу ІЛТ. Відпрацьовано технологічний регламент постановки реакції, виведено формулу для обліку результатів тестування і визначено позитивно-негативний поріг для діагностичної оцінки отриманих даних. Проведено визначення показників якості розробленої тест-системи ІФА у порівнянні з закордонними аналогами.

Практичне значення одержаних результатів полягає в оцінці епізоотичної ситуації щодо інфекційного ларинготрахеїту для птахівництва України. Особливе значення має інформація щодо циркулюючих різних патотипів вірусу ІЛТ для формування стратегії специфічної профілактики, підбору адекватних вакцин, які дозволять забезпечити максимальний захист птахопоголів'я. Виділені польові ізоляти вірусу ІЛТ можуть бути використані для контролю вакцинних препаратів, а також для проведення наукових досліджень. Опубліковані нуклеотидні послідовності частини гена українських ізолятів вірусу ІЛТ дозволять іншим вченим використовувати ці дані під час проведення власних досліджень. Уперше в Україні

розроблено технологічний регламент виготовлення та контролювання якості тест-системи «Набір компонентів для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом». За результатами лабораторних випробувань тест-система була визнана високочутливою, специфічною та такою, що дозволяє отримувати відтворювані результати. Розроблена вітчизняна тест-система ІФА для виявлення антитіл до вірусу ІЛТ дозволяє спростити постановку та здешевити контроль напруженості імунітету до вірусу ІЛТ у курей в птахівничих господарствах.

Основні результати роботи. На першому етапі проаналізовано результати лабораторних досліджень сироваток крові курей з промислових птахівничих господарств, які було проведено у відділі вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» у 2010–2017 роках. Установлено активну циркуляцію цього патогену в птахівничих господарствах 6 областей України (Харківська, Черкаська, Донецька, Хмельницька, Луганська, Херсонська). Так, рівень напруженості імунітету коливався від 4 до 100 %. Високий рівень імунітету (напруженість 65–100 %) було виявлено тільки у птиці з 35 % промислових птахівничих господарств, які проводили планову специфічну профілактику. Відсутність антитіл виявили тільки у курей двох господарств. У той же час, низький рівень напруженості імунітету (5,0–41,7 %) було виявлено у птиці з 7 господарств, що становить 50 % від загальної кількості досліджених. Ці птахівничі господарства не використовували вакцинацію проти ІЛТ у період проведення досліджень, тому наявність антитіл може свідчити про циркуляцію польових вірусів серед поголів'я птиці в цей період. Таким чином, нами серологічно доведено складну епізоотичну ситуацію щодо інфекційного ларинготрахеїту в Україні у 2010–2017 роках.

Другим етапом наших досліджень було проведення подальшого серологічного моніторингу курей у 2018–2021 роках. За цей період було обстежено 15 птахогосподарств різних областей України (Донецької, Харківської, Луганської, Черкаської, Хмельницької, Херсонської).

Результати засвідчили збереження напруженої епізоотичної ситуації щодо інфекційного ларинготрахеїту в птахівничих господарствах — достатній рівень імунітету було виявлено тільки в двох господарствах Запорізької області, де вакцинація проти ІЛТ включена до схеми специфічної профілактики. У більшості досліджених партій птиці з цих господарств рівень імунітету відповідав вимогам та становив 76,9 — 100 %. Хоча також було зареєстровано випадки, коли рівень напруженості імунітету у деяких партіях дорослої птиці був суттєво нижчий за необхідний — 8,3–61,5 %. У декількох партіях добового молодняку напруженість імунітету становила 40 %. Дуже низький рівень специфічного імунітету до ІЛТ було зафіксовано у птиці віком 475 діб. У п'яти господарствах ми виявили різний титр антитіл в ІФА (242–2659) та різний відсоток позитивних птахів (від 0 до 50 %). У той же час, статус вакцинації в цих господарствах невідомий. Вісім птахівничих господарств не проводили вакцинацію проти ІЛТ, і у птиці не було виявлено специфічних антитіл до вірусу. Таким чином, результати серологічного моніторингу свідчать про циркуляцію вірусу інфекційного ларинготрахеїту серед промислової птиці в Україні щонайменше з 2010 року (період наших спостережень та аналізу).

Ураховуючи результати серологічного моніторингу, наступним етапом було проведення вірусологічних досліджень, спрямованих на виділення вірусу та подальше вивчення його властивостей. Також цей етап включав дві складові — аналіз результатів лабораторних досліджень (результати розтину птиці та результати вірусологічних досліджень), які були проведені у відділі вивчення хвороб птиці протягом 2010–2017 років, а також лабораторних досліджень (розтин, вірусологічні дослідження), що були проведені в 2018–2021 роках для з'ясування відмінностей у вірусів, що циркулювали в різні часові періоди в Україні. За результатами вірусологічних досліджень у ННЦ «ІЕКВМ» із патологічного матеріалу від хворих птахів із патологоанатомічними змінами ІЛТ, який зібрано в період з 2010 по 2019 рр. у різних регіонах України, виділено 7 ізолятів вірусу ІЛТ.

Більшість з них — 5 вірусних ізолятів (Б 2-10, ЧП 96-10, Х 2-12, КДС, А 04-12) виділено від птиці, яку утримували у промислових птахівничих господарствах, і тільки два (В 59-11 та Суми/6-11/19) — від птиці, яка утримувалася у присадибних птахівничих господарствах. Також п'ять ізолятів (Б 2-10, ЧП 96-10, Х 2-12, КДС, Суми 6-11/19) було виділено від птиці, яка вакцинувалася проти інфекційного ларинготрахеїту відповідно до схеми вакцинації. У той же час, тільки два ізоляти (В 59-11 та А 04-12) було виділено від хворих курей, яких не вакцинували проти інфекційного ларинготрахеїту. Таким чином, комплексно аналізуючи результати епізоотологічного моніторингу у 2010–2021 роках, в Україні зафіксовано активну циркуляцію вірусу інфекційного ларинготрахеїту серед курей як з промислових, так і з присадибних птахівничих господарств.

Під час вивчення біологічних властивостей польових ізолятів ІЛТ, виділених в Україні в 2010–2019 роках, встановлено, що українські ізоляти вірусу ІЛТ не викликають аглютинацію еритроцитів півня, що свідчить про відсутність гемаглютинаційних властивостей у цих вірусів. Встановлено, що ізоляти ІЛТ здатні до активної репродукції в КЕ. Найбільш активним щодо репродукції в КЕ був ізолят В 59-11, виділений від невакцинованої птиці з присадибного птахівничого господарства у 2011 році. Він також мав найвищий летальний титр, що свідчить про його патогенність для КЕ. У інших ізолятів інфекційний титр був приблизно однаковим — $5,0\text{--}5,5 \lg \text{ЕІД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$, летальний титр коливався в межах $3,46\text{--}4,0 \lg \text{ЕЛД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$ за виключенням ізоляту А 04-12, летальний титр якого був $2,5 \lg \text{ЕЛД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$. Що стосується патогенності для птиці, то ізоляти вірусу ІЛТ Б 2-10, ЧП 96-10 та А 04-12 за експериментального інфікування у 100 % випадків викликали захворювання протягом 8–10 діб з характерними клінічними ознаками. Летальність реєстрували починаючи з 12–13 доби на рівні від 40 до 80 %. Також ізоляти вірусу ІЛТ викликали характерні патологоанатомічні зміни у експериментальних курчат. Типові для ІЛТ зміни також були виявлені і за гістологічних досліджень.

Молекулярно-генетичні дослідження українських ізолятів вірусу ІЛТ, виділених у різні роки в різних регіонах від птиці з промислових і присадибних птахівничих господарств, проводили у 3 етапи. На першому етапі здійснювали первинну ідентифікацію ізолятів у ПЛР, а також перевірку відсутності сторонньої контамінації іншими вірусами-збудниками інфекційних хвороб птиці. За результатами цих досліджень усі 7 ізолятів були ідентифіковані як вірус інфекційного ларинготрахеїту. Також встановлено, що ці ізоляти не містили інших вірусних збудників (вірусу ньюкаслської хвороби, грипу, інфекційного бронхіту, хвороби Гамборо, метапневмовірусної інфекції). Другим етапом було встановлення патотипу деяких ізолятів ІЛТ, тобто належність їх до вакциноподібних або польових ізолятів вірусу ІЛТ. Установлено, що в Україні у 2010–2019 роках циркулювали різні ізоляти вірусу інфекційного ларинготрахеїту. Із 4 ізолятів ІЛТ, які були задіяні у визначенні патотипу, більшість (три з чотирьох) належали до вакциноподібних ізолятів вірусу ІЛТ і тільки один — до польового вірусу. Необхідно зазначити, що всі вакциноподібні віруси були ізольовані від хворих і загиблих курей з промислових птахівничих господарств, де проводиться планова вакцинація проти ІЛТ у Сумській, Харківській та Донецькій областях. У той же час польовий вірус було ізольовано від загиблих курей із присадибного птахівничого господарства Харківської області, де вакцинація проти ІЛТ не проводиться.

За результатами філогенетичного аналізу ділянки гена тімідин-кінази (TK-gene) українських вірусів інфекційного ларинготрахеїту встановлено, що ці віруси розташовані в окремих кластерах. Так, вакциноподібний ізолят Б 2-10 (виділений від вакцинованої птиці) увійшов до великого кластеру, у якому розташовані як польові, так і вакцинні віруси, що циркулювали в різних країнах світу (США, Китай, Італія). Цей український вірус споріднений з епізоотичним вірусом US10, який використовується у США, як контрольний епізоотичний вірус. Що стосується польового ізоляту вірусу ІЛТ В 59-11 (виділений від невакцинованих курей), то він розташований

окремо від інших вірусів, у окремому кластері з польовим вірусом ІЛТ, який циркулював у Бразилії. Нуклеотидні послідовності частини гена тімідин-кінази українських вірусів ІЛТ опубліковані в базі даних GenBank номери доступу MZ323228, MZ333273).

Для удосконалення лабораторної діагностики інфекційного ларинготрахеїту нами було розроблено технологію вітчизняної діагностичної ІФА тест-системи, яка базується на використанні вітчизняного виробничого штаму вірусу ІЛТ. Було отримано усі специфічні компоненти діагностичної тест-системи для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту у сироватках крові курей на основі методу ІФА та відпрацьовано параметри постановки цієї реакції. Установлено, що оптимальне розведення антигену — 1:1000, кон'югату — 1:1000, дослідних та контрольних сироваток — 1:400. Розраховано математичне рівняння лінійної регресії для обчислення титру антитіл до інфекційного ларинготрахеїту в сироватках крові курей за дослідження в одному розведенні. Визначено позитивно-негативний поріг для інтерпретації результатів ІФА (сироватки крові з титром антитіл до 799 включно вважали негативними, від 800 і більше — позитивними). Специфічність та чутливість тест-системи за використання виробничої панелі сироваток (яка включала відомі позитивні та негативні сироватки, а також референтні гомологічні та гетерологічні позитивні сироватки) становили 100 %. Крім того встановлено, що коефіцієнт кореляції між результатами, отриманими за допомогою розробленої тест-системи та закордонного аналогу (тест-системи «BioCheck ILT ELISA») становив 0,82821 ($p < 0,05$), що свідчило про високий ступінь кореляційного зв'язку.

Ключові слова: біологічні властивості збудника, епізоотологічний моніторинг, інфекційний ларинготрахеїт, інфекційні хвороби, ІФА, патотипування збудника, ПЛР, свійська птиця, філогенетичний аналіз.

ANNOTATION

Veretsun A. L. Epizootological monitoring, biological properties of viral isolates and improvement of serological diagnostics of infectious laryngotracheitis. — Qualification scientific work on the rights of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 211 — Veterinary Medicine. — National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”. Kharkiv, 2025.

The dissertation work was conducted at the Department of Avian Diseases and Molecular Diagnostics of the National Scientific Center ‘Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine’, following the tasks: 38.01.02.02. F ‘To establish the eco-geographical features of pathogens of economically important viral infectious diseases (corona-, birna-, herpes-, circo-, pox- and paramyxovirus etiology) of poultry in different regions of Ukraine’ (state registration number 0116U000230) and 34.01.01. 07 P ‘Development of a modern system of monitoring, forecasting, specific prevention and control of virus-bacterial associations in poultry within the framework of the ‘One Health’ concept in connection with world globalization and climate change’ (state registration number 0121U108373).

Ensuring the epizootic safety of poultry farming is of the utmost importance. Viral infectious diseases of poultry are a pressing concern in this regard. Infectious laryngotracheitis, for example, is one of the so-called ‘economically significant’ infectious diseases in countries with developed commercial poultry production. While the infectious laryngotracheitis virus does not pose a threat to human health and does not cause disease in humans, it is dangerous for poultry. This disease is prevalent worldwide, particularly in countries with a high density of industrial poultry farms. A distinctive feature of infectious laryngotracheitis is its ability to manifest as a subclinical, latent form in vaccinated poultry, which

complicates diagnosis and prevention. The virus's ability to undergo genetic changes, which alter its pathogenicity, poses a significant challenge in preventing the disease. Therefore, it is crucial to closely monitor any changes in the genetic structure of the virus, as these changes can directly impact the pathogenicity of the circulating strains. Another key aspect to consider is the symptoms of infectious laryngotracheitis. This is a respiratory virus that affects the respiratory system. It must be differentiated from particularly dangerous infections such as influenza, Newcastle disease, and bacterial infections. Therefore, it is important to improve laboratory diagnostics. In this regard, the dissertation is devoted to the following: epizootological monitoring and the study of the spread of infectious laryngotracheitis virus in chickens in industrial and backyard poultry farms in different regions of Ukraine, isolation of the ILT pathogen from sick and dead chickens, study of their biological properties with differentiation of the origin of viruses from vaccine or field viruses, improvement of laboratory serological diagnosis of infectious laryngotracheitis in Ukraine. The work presents the comprehensive results of field and laboratory studies conducted from 2017 to 2024. These studies include serological monitoring, virological and molecular genetic studies, pathotyping of the pathogen, its phylogenetic analysis, and improvement of laboratory serological diagnostics through the development of a domestic technology for the production of an ELISA test system for the detection of specific antibodies to ILT virus.

The scientific novelty of the work lies in its comprehensive epizootic monitoring of infectious laryngotracheitis in chickens on poultry farms of various types (industrial and backyard) in different regions of Ukraine during the period 2010–2024. This study encompassed serological, virological, and molecular genetic analyses. Notably, it was the first study in Ukraine to examine the seroprevalence of the disease in both vaccinated and unvaccinated chickens on diverse poultry farms. New isolates of ILT virus were isolated from pathological material of dead and sick chickens. The biological properties of the Ukrainian ILT virus isolates obtained from poultry from industrial and private farms were

investigated, including their ability to cause erythrocyte agglutination and their reproductive capacity in chicken embryos. The disease was reproduced in the laboratory, and the histological changes caused by this virus were determined. The consequences of these changes were also assessed. For the first time in Ukraine, the circulation of both vaccine-like and field isolates of ILT virus has been established based on the results of virological studies and further molecular genetic studies. For the first time, partial sequencing of the ILT virus genome and phylogenetic analysis of isolates circulating in Ukraine among poultry have been performed, and the origin of the pathogen has been established. For the first time in Ukraine, a procedure for obtaining ILT virus antigen for an ELISA test system for determining specific antibodies to ILT virus was developed. The technological procedure for setting up the reaction was developed, a formula for recording test results was derived, and a positive-negative threshold for diagnostic evaluation of the data was determined. The quality indicators of the developed ELISA test system were determined in comparison with foreign analogues.

The practical significance of the results obtained is to assess the epizootic situation regarding infectious laryngotracheitis for the poultry industry in Ukraine. Information on the circulating different pathotypes of ILT virus is particularly important because it can be used to formulate a strategy for specific prevention and to select adequate vaccines that will ensure maximum protection of poultry. The isolated field isolates of ILT virus can be used to control vaccine preparations and for scientific research. The published nucleotide sequences of a part of the gene of Ukrainian ILT virus isolates will allow other scientists to use these data in their research. For the first time in Ukraine, a technological regulation for the manufacture and quality control of the test system ‘A set of components for the determination of antibodies to infectious laryngotracheitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay’ was developed. Based on the results of laboratory tests, the test system was recognized as highly sensitive, specific, and reproducible. The developed domestic ELISA test system for the detection of antibodies to ILT virus allows for simplifying the procedure and

reducing the cost of monitoring the intensity of immunity to ILT virus in chickens in poultry farms.

The primary results of the study are as follows:

At the initial stage, the findings from laboratory tests of blood sera from chickens from industrial poultry farms were examined. These tests were conducted at the Department of Avian Diseases of the National Scientific Center 'IECVM' from 2010 to 2017. The active circulation of the pathogen in question has been identified in poultry farms located in six regions of Ukraine: Kharkiv, Cherkasy, Donetsk, Khmelnytsky, Luhansk, and Kherson. The level of immunity varied, ranging from 4 to 100 %. Notably, a high level of immunity, defined as 65–100 %, was observed in poultry from 35 % of industrial poultry farms that implemented scheduled specific prophylaxis. The absence of antibodies was detected in chickens from two farms. At the same time, a low level of immune tension (5.0–41.7 %) was found in poultry from seven farms, which is 50 % of the total number of poultry studied. These poultry farms did not use ILT vaccination during the study period, so the presence of antibodies may indicate the circulation of field viruses among poultry during this period. Consequently, we have serologically confirmed the complex epizootic situation regarding infectious laryngotracheitis in Ukraine from 2010 to 2017.

The second stage of our research entailed additional serological monitoring of chickens from 2018 to 2021. During this period, we conducted comprehensive assessments at 15 poultry farms across various regions of Ukraine, including Donetsk, Kharkiv, Luhansk, Cherkasy, Khmelnytsky, and Kherson. The results of the study indicate that the epidemiological situation regarding infectious laryngotracheitis (ILT) in poultry farms remains challenging. The analysis revealed that only two farms in the Zaporizhzhia region, where ILT vaccination is part of the specific prevention scheme, demonstrated a sufficient level of immunity. Furthermore, the majority of the tested batches of poultry from these farms exhibited levels of immunity that met the established requirements, ranging from 76.9 % to 100 %. However, there were also cases when the level of

immunity in some batches of adult poultry was significantly lower than required, ranging from 8.3 % to 61.5 %. In several batches of day-old poultry, the immune tension was recorded at 40 %. A very low level of specific immunity to ILT was identified in birds aged 475 days. In the five farms under investigation, we found different antibody titers in ELISA (242–2659) and different percentages of positive birds (from 0 to 50 %). At the same time, the vaccination status of these farms is unknown. Eight poultry farms did not vaccinate against ILT, and no specific antibodies to the virus were detected in poultry. Therefore, the results of serological monitoring indicate that infectious laryngotracheitis virus has been circulating among commercial poultry in Ukraine at least since 2010 (the period of observation and analysis).

After reviewing the results of the serological monitoring, the next step was to conduct virological studies. These studies aimed to isolate the virus and further study its properties. This stage comprised two components. First, an analysis of the results of laboratory tests (poultry dissection results and virological studies) conducted in the Department of Avian Diseases during 2010–2017 was conducted. Second, laboratory tests (dissection, virological studies) conducted in 2018–2021 were used to determine the differences in viruses circulating in different periods in Ukraine. According to the results of virological studies conducted at the NSC 'IECVM', seven isolates of ILT virus were identified from pathological material from sick birds with pathological changes. These isolates were collected from 2010 to 2019 in various regions of Ukraine. The majority of the isolates, five viral isolates (B 2-10, ChP 96-10, X 2-12, KDS, A 04-12) were isolated from poultry kept in industrial poultry farms, and only two (B 59-11 and Sumy/6-11/19) were isolated from poultry kept in private poultry farms. Furthermore, five isolates (B 2-10, ChP 96-10, X 2-12, KDS, Sumy/6-11/19) were isolated from poultry vaccinated against infectious laryngotracheitis following the vaccination schedule. At the same time, only two isolates (B 59–11 and A 04-12) were identified in sick chickens that were not vaccinated against infectious laryngotracheitis. Therefore, a comprehensive analysis of the results of

epizootic monitoring in 2010–2021 revealed active circulation of infectious laryngotracheitis virus among chickens from both industrial and private poultry farms in Ukraine.

During the study of the biological properties of field isolates of ILT isolated in Ukraine from 2010 to 2019, it was determined that Ukrainian isolates of ILT virus do not cause agglutination of rooster erythrocytes. This finding indicates the absence of hemagglutination properties in these viruses. Furthermore, it was determined that ILT isolates are capable of active reproduction in chicken embryos (CE). In terms of reproduction, isolate B 59-11 was the most active in the CE. Isolate B 59-11 was isolated from unvaccinated birds from a backyard poultry farm in 2011. It also had the highest lethal titer, indicating its pathogenicity for CE. The infectious titer of the other isolates was approximately the same, ranging from 5.0 to 5.5 log EID₅₀/0.1 ml. The lethal titer ranged from 3.46 to 4.0 log EID₅₀/0.1 ml, except for isolate A 04-12, which had a lethal titer of 2.5 log EID₅₀/0.1 ml. Regarding the pathogenicity of the ILT virus isolates for poultry, B 2-10, ChP 96-10, and A 4-12 caused disease in 100 % of cases during experimental infection, exhibiting characteristic clinical signs within 8–10 days. Mortality was recorded starting from day 12–13 at a rate of 40–80 %. ILT virus isolates also caused characteristic pathological changes in experimental chickens. Histological studies revealed changes consistent with ILT.

Molecular genetic studies of Ukrainian isolates of ILT virus, isolated in different years in different regions from poultry from industrial and backyard poultry farms, were carried out in three stages. At the first stage, the primary identification of isolates by PCR was performed, as well as checking the absence of foreign contamination with other viruses causing infectious diseases of poultry. Based on the results of these studies, all seven isolates were identified as infectious laryngotracheitis virus. It was determined that these isolates did not contain other viral pathogens, including Newcastle disease virus, influenza, infectious bronchitis, Gumboro disease, and metapneumovirus infection. The second stage of the study involved determining the pathotype of some ILT

isolates, i. e., whether they belonged to vaccine-like or field isolates of ILT virus. The research revealed the circulation of different isolates of infectious laryngotracheitis virus in Ukraine from 2010 to 2019. Of the four ILT isolates involved in pathotyping, the majority (three out of four) belonged to vaccine-like ILT virus isolates, with only one belonging to a field virus. Notably, all vaccine-like viruses were isolated from chickens exhibiting signs of illness or dead ones on industrial poultry farms. These farms are located in the Sumy, Kharkiv, and Donetsk regions, where routine ILT vaccination programs are implemented. Concurrently, a field virus was isolated from dead chickens from a backyard poultry farm in the Kharkiv region, where ILT vaccination is not currently implemented.

Phylogenetic analysis of the thymidine kinase (TK) gene of Ukrainian infectious laryngotracheitis viruses reveals the presence of distinct clusters. Notably, the vaccine-like isolate B 2-10, isolated from vaccinated poultry, was found within a substantial cluster comprising both field and vaccine viruses that have circulated in various countries, including the USA, China, and Italy. This Ukrainian virus is related to the epizootic virus US10, which is used in the United States as a control epizootic virus. As for the field isolate of ILT virus B 59-11 (isolated from unvaccinated chickens), it is located separately from other viruses, in a separate cluster with the field ILT virus circulating in Brazil. Nucleotide sequences of a part of the thymidine kinase gene of Ukrainian ILT viruses have been published in the GenBank database (accession numbers MZ323228, MZ333273).

We have developed a domestic diagnostic ELISA test system for the improved laboratory diagnosis of infectious laryngotracheitis. This system is based on a domestic production strain of ILT virus. We obtained all specific components of the diagnostic test system for the determination of antibodies to infectious laryngotracheitis virus in chicken sera based on the ELISA method, and we worked out the parameters of this reaction. The optimal dilution of the antigen was determined to be 1:1000, the conjugate was found to be 1:1000, and

the experimental and control sera were determined to be 1:400. A mathematical equation of linear regression was developed to calculate the titer of antibodies to infectious laryngotracheitis in chicken sera for a single dilution study. The positive-negative threshold for the interpretation of ELISA results was determined as follows: sera with an antibody titer of up to and including 799 were considered negative, and those with a titer of 800 or more were considered positive. The specificity and sensitivity of the test system when using the production serum panel (which included known positive and negative sera, as well as reference homologous and heterologous positive sera) were 100 %. In addition, it was determined that the correlation coefficient between the results obtained using the developed test system and a foreign analog (BioCheck ILT ELISA test system) was 0.82821 ($p < 0.05$), indicating a high degree of correlation.

Keywords: biological properties of the pathogen, epizootological monitoring, infectious laryngotracheitis, infectious diseases, ELISA, pathotyping of the pathogen, PCR, poultry, phylogenetic analysis.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

*Статті у наукових фахових виданнях, що індексуються
у наукометричних базах Scopus і/або Web of Science*

1. Veretsun, A., Stegnyy, B., Usova, L., Rula, O., & Muzyka, D. (2021). The experimental infection of vaccine-like isolates of Infectious laryngotracheitis virus isolated in Ukraine in 2010–2012. *Veterinarija ir Zootechnika*, 79(2), 25–31. <https://vetzoo.lsmuni.lt/data/vols/2021/7902/pdf/veretsun.pdf>. (Дисертантом проведено вірусологічні дослідження та аналіз отриманих даних).

2. Veretsun, A., Stegnyy, B., Rula, O., Bolotin, V., Stegnyy, A., Gerilovych, A., & Muzyka, D. (2021). Molecular and genetic characterization

of Avian laryngotracheitis virus isolates obtained in Ukraine. *Agricultural Science and Practice*, 8(1), 37–46. <https://doi.org/10.15407/agrisp8.01.032>. (Дисертант провів аналіз отриманих даних).

Статті у наукових фахових виданнях України категорії «Б»

3. Музика, Д. В., **Верещун, А. Л.**, Стегній, А. Б., Рула, О. М., & Усова, Л. П. (2018). Виділення та ідентифікація епізоотичного ізоляту вірусу інфекційного ларинготрахеїту. *Ветеринарна медицина*, 104, 137–142. https://jvm.kharkov.ua/sbornik/104/VetMed_104.pdf. (Дисертант провів аналіз епізоотичної ситуації щодо ІЛТ в Україні та дослідження з ізоляції збудника).

4. **Верещун, А. Л.**, Рула, О. М., Усова, Л. П., & Музика, Д. В. (2021). Циркуляція вірусу інфекційного ларинготрахеїту у птахівничих господарствах України у 2009–2020 роках. *Ветеринарна біотехнологія*, 38, 21–35. https://doi.org/10.31073/vet_biotech38-02. (Дисертант провів збір біологічного матеріалу, вірусологічні дослідження та аналіз отриманих даних).

5. **Верещун, А. Л.**, & Усова, Л. П. (2021). Очистка та концентрування антигену для ІФА з використанням епізоотичних ізолятів вірусу інфекційного ларинготрахеїту, виділених в Україні. *Ветеринарна медицина*, 107, 65–70. <https://doi.org/10.36016/VM-2021-107-11>. (Дисертант здійснив первинну підготовку вірусотримуючої рідини для виготовлення антигену).

Праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Матеріали наукових доповідей

6. Usova, L., **Veretsun, A.**, & Muzyka, D. (2019). Infectious laryngotracheitis in Ukraine in 2010–2018: Epizootological monitoring and study of biological properties of field isolates. *4th Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium (Kyiv, Ukraine, 20–24 May 2019): abstracts* (p. 239). (Дисертант приймав участь у проведенні досліджень, аналізі результатів,

підготовці тез до друку, підготовці постеру, а також презентував ці результати на симпозіумі).

7. **Верецун, А.,** & Музика, Д. (2021). Серологічний моніторинг інфекційного ларинготрахеїту в Україні. *Матеріали III щорічної міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні епідемічні виклики в концепції «Єдине здоров'я», м. Тернопіль, 18–19 травня 2021 року* (с. 16). <http://ivm.kiev.ua/wp-content/uploads/ПРОГРАМА-повна-2021.pdf>. (Дисертант приймав участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку).

8. **Верецун, А. Л.,** Усова, Л. П., & Музика, Д. В. (2024). Вітчизняна тест-система для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом. *Тези доповідей онлайн-конференції аспірантів і молодих вчених у сфері Єдиного здоров'я та біотехнології «VetBioConnect», м. Харків, 3–4 червня 2024 року* (с. 51–53). https://www.iekvm.kharkov.ua/documents/VetBioConnect_2024_theses.pdf. (Дисертант приймав участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку).

Праці, які додатково відображають наукові результати дисертації

Патент України на корисну модель

9. Усова, Л. П., Музика, Д. В., Стегній, Б. Т., **Верецун, А. Л.,** & Рула, О. М. (2021). Тест-система для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом (Патент на корисну модель UA 147074). Національний орган інтелектуальної власності Державне підприємство «Український інститут інтелектуальної власності». <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1587091>. (Дисертант провів дослідження з розробки та перевірки якості тест-системи).

З М І С Т

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	22
ВСТУП	24
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	32
1.1 Загальна характеристика інфекційного ларинготрахеїту	32
1.2. Збудник інфекційного ларинготрахеїту	34
1.3. Реплікація вірусу ІЛТ	36
1.4 Антигенні властивості вірусу ІЛТ	38
1.5 Фізико-хімічні властивості вірусу ІЛТ	38
1.6 Природні господарі вірусу ІЛТ	39
1.7. Передача вірусу	39
1.8 Епізоотологічні дані хвороби	40
1.9 Патогенез	43
1.10 Клінічні ознаки	44
1.11. Патологоанатомічні зміни	45
1.12 Методи діагностики ІЛТ	47
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	49
2.1 Відбір матеріалу	49
2.2 Серологічні дослідження	50
2.3 Вірусологічні дослідження	50
2.4 Молекулярно-генетичні дослідження	53
2.5 Ізоляти вірусу ІЛТ, які використані в роботі	54
2.6 Дослідні тварини	55
2.7 Гістологічні дослідження	55
2.8 Реактиви та матеріали для ІФА	56
2.9 Статистична обробка	58
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	59

	21
3.1 Епізоотологічний моніторинг інфекційного ларинготрахеїту курей в Україні	59
3.1.1 Аналіз даних серологічного моніторингу інфекційного ларинготрахеїту в промислових господарствах в період 2010-2017 років	59
3.1.2 Серологічний моніторинг інфекційного ларинготрахеїту в промислових господарствах в період 2018-2021 років	61
3.1.3 Аналіз клінічних випадків захворювання курей на ІЛТ та результатів вірусологічних досліджень архівних біологічних зразків з підозрою на ІЛТ в 2010-2017 роках	65
3.1.4 Вірусологічні дослідження та виділення вірусу інфекційного ларинготрахеїту від хворих курей в 2019 році	75
3.2 Вивчення біологічних властивостей польових ізолятів вірусу інфекційного ларинготрахеїту, які циркулюють в Україні	78
3.3 Вивчення молекулярно-генетичних властивостей польових ізолятів вірусу ІЛТ	90
3.4 Удосконалення серологічної діагностики інфекційного ларинготрахеїту	94
3.4.1 Одержання специфічних компонентів для імуноферментної тест-системи	94
3.4.2 Отримання очищених концентрованих антигенів вірусів ІЛТ та визначення їх придатності для використання в якості компоненту тест-систем ІФА	95
3.4.3 Визначення параметрів постановки реакції ІФА та виготовлення тест-системи для виявлення антитіл до вірусу ІЛТ	97
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	106
ВИСНОВКИ	112
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	116
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	117
ДОДАТКИ	140

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АБТС	— 2,2`-азіно-ди(3-бензтіазолінсульфонова кислота)
АГ	— антиген
АТ	— антитіло
БСА	— бичачий сироватковий альбумін
ВППП	— високопатогенний грип птиці
ГА	— гемаглютинація
ГАО	— гемаглютинуюча одиниця
ДСН	— додецилсульфат натрію
ДНК	— дезоксирибонуклеїнова кислота
ІБК	— інфекційний бронхіт курей
ІБХ	— інфекційна бурсальна хвороба
ІЛТ	— інфекційний ларинготрахеїт
ІФА	— імуноферментний аналіз
ЕЕР	— екстраембріональна рідина
ЕІД	— ембріональний інфекційний титр
ЕЛД	— ембріональний летальний титр
К ⁻	— негативна контрольна сироватка
К ⁺	— позитивна контрольна сироватка
КББ	— карбонатно-бікарбонатний буфер
кДНК	— комплементарна дезоксирибонуклеїнова кислота
КЕ	— курячі ембріони
М	— моль
МПВ	метапневмовірус
НХ	— ньюкаслська хвороба
ОГ	— оптична густина
ОД	— одиниці дії

ПЕГ	— поліетиленгліколь
ПЛР	— полімеразно-ланцюгова реакція
РГА	— реакція гемаглютинації
РНК	— рибонуклеїнова кислота
СОП	— стандартна операційна процедура
Т	— титр
ТБ	— тріс-буфер
ХАО	— хоріон-алантоїсна оболонка
ФСБ	— фосфатно-сольовий буфер
ФЦБ	— фосфатно-цитратний буфер
CV	— коефіцієнт варіації
СЕО	— вакцини, що виготовлені на основі вірусу, який культивується в курячих ембріонах
Ig G	— імуноглобулін класу G
Lg	— десятковий логарифм
$M \pm m$	— середня арифметична, помилка середньої арифметичної
g	— кутове прискорення при ультрацентрифугуванні
NCx	— середнє значення оптичної густини негативного контролю
PCx	— середнє значення оптичної густини позитивного контролю
pH	— концентрація іонів водню
S/P	— відношення різниці оптичної густини дослідної сироватки з негативною контрольною до різниці оптичної густини позитивної та негативної контрольних сироваток
ТСО	— вакцини, що виготовлені на основі вірусу, що культивується в культурах клітин
WOAH	— Всесвітня організація охорони здоров'я тварин

ВСТУП

Птахівництво є галуззю, що швидко розвивається та відіграє важливу роль у світовій продовольчій безпеці. В Україні птахівництво є однією з базових галузей економіки, яка забезпечує населення не тільки продуктами харчування, але і робочими місцями, підтримує соціальну інфраструктуру, особливо в сільських територіях, забезпечує функціонування суміжних галузей. Крім того, за останніми оцінками, українське промислове птахівництво займає одну з лідируючих позицій щодо експорту птахівничої продукції в Європейський союз (*Офіційний сайт Асоціації «Союз птахівників України»*, 2014).

У зв'язку з особливостями та специфікою галузі, птахівництво є дуже чутливим до різноманітних зовнішніх факторів, які можуть впливати на ефективність роботи. Одним з таких факторів є інфекційні хвороби. На жаль, людство співіснує з величезною кількістю патогенів, які можуть негативним чином впливати на здоров'я та добробут людини. Багато патогенів відомі достатньо давно та людство навчилося з ними боротися, але в той же час діяльність людини (глобалізація, зміни клімату, сучасні технології утримання тварин та птиці) призводять до появи нових патогенів, або змін у давно відомих патогенах, що може робити їх більш патогенними та небезпечними. На жаль, ми не можемо побороти та повністю знищити патогени, тому єдиним виходом є постійне спостереження за ними, вивчення їх властивостей та подальше вдосконалення діагностики та профілактики.

Так, до групи давно відомих захворювань належить інфекційний ларинготрахеїт, але в той же час це захворювання не втратило свою актуальність. На сьогодні, інфекційний ларинготрахеїт птиці (ІЛТ) — широко розповсюджена вірусна контагіозна респіраторна хвороба, здебільшого курей різного віку. Хоча основним господарем інфекції

вважаються кури (Bagust, 1986), природна хвороба зареєстрована у павичів і фазанів (Crawshaw & Boycott, 1982). Інші види птахів (ворони, голуби, шпаки, горобці, качки) є стійкими до інфікування (Saif & Fadly, 2008). Захворювання спричиняє виникнення додаткових виробничих витрат, а, відповідно, знижує економічну ефективність та підвищує збитки через збільшення захворюваності птиці, її загибель, зниження яєчної продуктивності, витрат на вимушені ветеринарно-санітарні заходи, а також на лікувальні та профілактичні заходи з метою зменшення вторинних інфекцій.

Захворювання реєструється практично постійно у більшості країн з розвиненим птахівництвом. За даними Міжнародного епізоотичного бюро в період 2009–2019 років інфекційний ларинготрахеїт було зареєстровано у 52 країнах світу. У тому числі, у країнах з розвиненим птахівництвом — США, Бразилія, Мексика, Китай, Канада. В Європі інфекційний ларинготрахеїт у цей період реєструвався в Німеччині, Австрії, Данії, Фінляндії, Угорщині, Ірландії. Не дивлячись на те, що захворювання та збудник інфекції відомий достатньо давно, актуальність його не знижується і до тепер, тому необхідним є проведення постійного епізоотологічного моніторингу циркуляції вірусу ІЛТ у птахівничих господарствах, індикація, вивчення біологічних, молекулярно-генетичних властивостей, розробка нових засобів діагностики та специфічної профілактики (Gowthaman et al., 2020).

Що стосується України, то наша країна має достатньо розвинене промислове птахівництво. У довоєнний період за обсягами виробництва продукції птахівництва та її експорту Україна належала до світових лідерів. Також необхідно зазначити, що в Україні велика частка присадибного птахівництва, яке вносить певний вклад в економіку країни, забезпечує людей робочими місцями та продуктами харчування. На сьогоднішній день в цілому Україна є благополучною щодо гострих інфекційних захворювань птиці, за виключенням деяких регіонів, де були зареєстровані випадки

захворювання диких птахів на високопатогенний грип (*OIE Disease Information*, 2014). У промислових птахівничих господарствах суворо дотримуються сучасних ветеринарно-санітарних вимог, що дає змогу надійно контролювати епізоотичну ситуацію. Що стосується присадибних господарств, то в них не завжди дотримуються усіх необхідних вимог, у результаті чого реєструються випадки захворювань птиці на інфекційні хвороби. Для України ІЛТ не нова інфекція — вперше її було зареєстровано у 1932 році. Із розвитком промислового птахівництва розпочалося поширення також і ІЛТ. Широке розповсюдження ІЛТ фіксували у 70–80-х роках минулого сторіччя, коли захворювання виявляли багаторазово у великих промислових птахівничих господарствах (Бабкін et al., 1997). Що стосується сучасної ситуації, то за останні 10 років в Україні було зафіксовано декілька випадків захворювання курей на ІЛТ у різних регіонах країни: у Харківській області у 2010–2012 роках, у Луганській області у 2010 р, у Донецькій області у 2012 р., в АР Крим у 2012 р. (Воротілова, 2014; Стегній & Воротілова, 2012, 2013; Стегній et al., 2013b, 2013c).

Таким чином, можна зробити висновок, що ІЛТ є важливим патогеном для птахівництва України, але на сьогоднішній день відкритим питанням залишається вивчення біологічних та молекулярно-генетичних властивостей ізолятів, які циркулюють в Україні, їх патотип (належність до вакциноподібних чи польових ізолятів), а також походження. Також важливим є розробка та впровадження вітчизняних засобів діагностики ІЛТ, у тому числі із застосуванням імуноферментного аналізу.

Актуальність теми. Проведення постійного епізоотичного моніторингу за циркуляцією інфекційного ларинготрахеїту в Україні — як серед птиці промислового сектору, так і серед птиці присадибного сектору — є одним з актуальних та важливих напрямків ветеринарного супроводу птахівництва. Причому важливим є не тільки контроль наявності збудника серед птиці в країні, а і вивчення його біологічних та молекулярно-генетичних властивостей, порівняння його з відомими

вакцинними та польовими вірусами. Також актуальним та важливим є розробка та впровадження вітчизняних діагностичних тест-систем для діагностики захворювання і контролю напруженості імунітету. Сьогодні в Україні для серологічної діагностики більшості інфекційних захворювань птиці використовують тест-системи, розроблені на основі імуноферментного аналізу, але здебільшого це комерційні тест-системи закордонного виробництва «IDEXX Laboratories» (США), «BioCheck» (Великобританія) та «Synbiotics Corporation» (США). Важливо зазначити, що за рахунок їх високої вартості, використання цих тест-систем може бути обмеженим. Крім того, наявність власних вітчизняних розробок є питанням національної біобезпеки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась протягом 2017–2024 рр. у відділі хвороб птиці та молекулярної діагностики й птахівничих господарствах різних форм власності в Запорізькій, Харківській, Сумській, Донецькій, Херсонській, Дніпропетровській, Луганській, Черкаській, Хмельницькій областях. Дисертаційна робота є складовою частиною наукових досліджень, виконаних згідно з програмами наукових досліджень НААН і тематичними планами ННЦ «ІЕКВМ» та завданнями 38.01.02.02. Ф «Встановити еко-географічні особливості збудників економічно значимих вірусних інфекційних захворювань (корона-, бірна-, герпес-, цирко-, покс- та параміксовірусної етіології) сільськогосподарської птиці в різних регіонах України» (номер державної реєстрації 0116U000230), завданням 34.01.01.07 П «Розроблення сучасної системи моніторингу, прогнозування, специфічної профілактики та контролю вірус-бактеріальних асоціацій у сільськогосподарської птиці в рамках концепції «Єдиного здоров'я» у зв'язку зі світовою глобалізацією та змінами клімату» (номер державної реєстрації 0121U108373).

Мета і задачі досліджень. Мета досліджень — вивчити епізоотичну ситуацію щодо інфекційного ларинготрахеїту курей в Україні, ізолювати

збудника, вивчити його біологічні, молекулярно-генетичні властивості та вдосконалити серологічну лабораторну діагностику методом ІФА.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі задачі:

- провести аналіз епізоотологічної ситуації щодо інфекційного ларинготрахеїту в світі та Україні, у тому числі в попередні роки;
- провести серологічний моніторинг щодо наявності специфічних антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту у курей з промислових птахівничих господарств різних областей України;
- провести вірусологічні дослідження патологічного матеріалу від хворих та загинувших курей з ознаками ураження респіраторної системи, які були отримані з птахівничих господарств у період 2009–2020 років;
- ідентифікувати ізольовані віруси, вивчити біологічні та молекулярно-генетичні властивості українських ізолятів ІЛТ, а також гістологічні зміни, які вони викликають під час експериментального інфікування;
- розробити методику очищення та концентрування антигену вірусу інфекційного ларинготрахеїту курей для виготовлення ІФА тест-системи;
- розробити вітчизняну ІФА тест-систему для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту курей,
- провести лабораторні випробування розробленої ІФА тест-системи.

Об'єкт дослідження: інфекційний ларинготрахеїт курей.

Предмет дослідження: епізоотична ситуація щодо інфекційного ларинготрахеїту курей в різних областях України, серологічна діагностика інфекційного ларинготрахеїту курей, технологічні етапи отримання специфічних компонентів для діагностичної ІФА тест-системи для виявлення антитіл до вірусу ІЛТ в ІФА.

Методи досліджень: епізоотологічний, серологічні, вірусологічні, клінічні, патологоанатомічні, молекулярно-генетичні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Проведено вивчення та аналіз епізоотичної ситуації щодо інфекційного ларинготрахеїту курей у світі та в різних областях України в період 2010–2020 рр., за результатами серологічних досліджень встановлена циркуляція вірусу ІЛТ в птахівничих господарствах, де не проводиться вакцинація проти цього захворювання, із патологічного матеріалу загинувших та хворих курей виділено ізоляти вірусу ІЛТ. Уперше вивчено біологічні властивості українських ізолятів вірусу ІЛТ, які виділені від птиці з промислових та присадибних птахівничих господарств. Відтворено захворювання в умовах лабораторії та визначено гістологічні зміни, які з'являються під впливом цього вірусу. Уперше в Україні за результатами вірусологічних досліджень, а також подальших молекулярно-генетичних досліджень встановлена циркуляція як вакциноподібних, так і польових ізолятів вірусу ІЛТ. Уперше проведено часткове секвенування геному вірусу ІЛТ, філогенетичний аналіз ізолятів ІЛТ, що циркулюють в Україні серед свійської птиці. Уперше в Україні розроблено регламент отримання антигену вірусу ІЛТ для тест-системи ІФА для визначення специфічних антитіл до вірусу ІЛТ. Відпрацьовано технологічний регламент постановки реакції, виведено формулу для обліку результатів тестування і визначено позитивно-негативний поріг для діагностичної оцінки отриманих даних. Проведено визначення показників якості розробленої тест-системи ІФА порівняно з іншими закордонними аналогами.

Практичне значення одержаних результатів. Результати епізоотичного моніторингу доводять важливість інфекційного ларинготрахеїту для птахівництва України, а також свідчать про необхідність звернути більше уваги на питання діагностики та специфічної профілактики цього захворювання. Виділені польові ізоляти вірусу ІЛТ можуть бути використані для контролю вакцинних препаратів, а також для проведення наукових досліджень. Опубліковані нуклеотидні послідовності частини гена українських ізолятів вірусу ІЛТ дозволять іншим вченим

використовувати ці дані для проведення власних досліджень. Уперше в Україні розроблено технологічний регламент виготовлення та контролювання якості тест-системи «Набір компонентів для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом». За результатами лабораторних випробувань тест-система була визнана високочутливою, специфічною та такою, що дозволяє отримувати відтворювані результати. Розроблена вітчизняна тест-система ІФА для виявлення антитіл до вірусу ІЛТ дозволяє спростити постановку та здешевити контроль напруженості імунітету у курей у птахівничих господарствах.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом особисто обрано та обґрунтовано напрям досліджень (під керівництвом наукового керівника), проведено аналіз літературних даних за темою роботи, сформульовано мету та задачі роботи, особисто виконано експериментальні та аналітичні дослідження, проведено аналіз та узагальнення одержаних результатів, сформульовано висновки та практичні пропозиції.

Вірусологічні дослідження були проведені спільно з кандидатом ветеринарних наук О. М. Рулою, патоморфологічні дослідження були проведені спільно з кандидатом ветеринарних наук К. О. Медвідь, дослідження з очищення та концентрування вірусу інфекційного ларинготрахеїту були проведені спільно з кандидатом ветеринарних наук Л. П. Усовою.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи доповідалися, обговорювалися та були схвалені на: звітних сесіях вченої ради ННЦ «ІЕКВМ» (2018–2024 рр., усні доповіді); регіональному науковому симпозіумі в рамках концепції «Єдине здоров'я» за підтримки ПЗСБД (Програми залучення до спільної біологічної діяльності) 4th Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium (м. Київ, 2019 р.); III щорічній міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні епідемічні виклики в концепції «Єдине здоров'я» (м. Тернопіль, 2021 р.); онлайн-

конференції аспірантів і молодих вчених у сфері Єдиного здоров'я та біотехнології «VetBioConnect» (м. Харків, 2024 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 9 наукових праць, з них: 2 статті у наукових фахових виданнях, що індексуються у наукометричних базах Scopus і/або Web of Science, 3 статті — у наукових фахових виданнях України категорії «Б», 3 тез наукових конференцій і симпозіумів та 1 опис до патенту України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено на 155 сторінках друкованого тексту, ілюстровано 27 таблицями та 31 рисунком. Робота складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів власних досліджень, їх аналізу й узагальнення, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних літературних джерел, який містить 171 найменування, у тому числі 150 іноземних авторів, і додатків.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальна характеристика інфекційного ларинготрахеїту

Інфекційний ларинготрахеїт є надзвичайно контагіозною хворобою верхніх дихальних шляхів у курей і, на сьогоднішній день, розглядається як одна з основних проблем для свійської промислової птиці (Bagust et al., 2000). Уважається, що хворіють головним чином кури (Bagust, 1986), але у природних умовах захворювання зареєстроване також у павичів і фазанів (Crawshaw & Boycott, 1982). Інші види, у тому числі з родини Курячих, а також ворони, качки, голуби, горобці, шпаки вважаються стійкими до інфікування (Guy, 2008).

У промислових умовах хвороба спричиняє виробничі втрати внаслідок збільшення захворюваності свійської птиці, її смертності, зниження приросту живої ваги, несучості. Також захворювання призводить до збільшення витрат на ветеринарно-санітарні заходи (вакцинацію, додаткові заходи біозахисту, антибіотикотерапію для боротьби з вторинним бактеріальним інфікуванням) (García et al., 2013; Guy, 2008; Jones, 2010).

У курей описані дві основні форми ІЛТ. Перша — важка гостра форма, що характеризується значним респіраторним синдромом, чханням, відхаркуванням слизу, змішаного з кров'ю, важким геморагічним трахеїтом та кон'юнктивітом, супроводжується високою смертністю до 70 %. Друга — більш легка форма, характеризується легким та середнім ступенем катарального трахеїту, синуситу, кон'юнктивіту, відносно низькою захворюваністю та смертністю — зазвичай коливається від 0,1 до 2 % (Ou & Giambrone, 2012).

На сьогоднішній день для боротьби з ІЛТ розроблені та широко використовуються специфічні засоби профілактики. Здебільшого в промисловому птахівництві використовують вакцини, що виготовлені на

основі вірусу, який культивується в курячих ембріонах (СЕО-вакцини), а також на основі вірусу, який культивується в культурах клітин (ТСО-вакцини). Обидва типи вакцин були розроблені у 60-х роках минулого сторіччя та на сьогодні широко використовуються для боротьби із спалахами ІЛТ у всьому світі. У зв'язку з тим, що вакцини, розроблені на обох цих платформах, виготовляються з використанням живого атенуйованого вірусу, існує можливість його реверсії до первинного вірулентного вірусу, який буде здатний активно поширюватися від птиці до птиці. Уважається, що на сьогодні більшість спалахів спричинені саме ізолятами, які мають походження від СЕО-вакцин. У результаті застосування таких препаратів вакцинні віруси тривалий час персистують в організмі птиці та здатні до неконтрольованої передачі від популяції до популяції (Blacker et al., 2011). Останнім часом все більшого поширення набувають рекомбінантні (векторні) вакцини, які вважаються більш безпечною альтернативою. Але водночас вони мають обмежену практичну цінність, оскільки вони не можуть повністю зупинити виділення польового вірусу, а наявність антитіл проти векторів у птиці може повністю чи частково нейтралізувати вакцину.

Збільшення захворюваності на ІЛТ, як правило, залежить від сторонніх факторів, таких як утримання, годівля, порушення ветеринарно-санітарних умов (збільшення щільності посадки птиці, скорочення виробничих перерв після завершення циклу виробництва, недоліки біозахисту та неякісна вакцинація). На сьогоднішній день, у науковій літературі є повідомлення про реверсію вірусу та його виділення за використання вакцин у комерційному птахівництві (Thilakarathne et al., 2020).

Отже, враховуючи усе вище зазначене, ІЛТ є актуальним захворюванням для птахівництва, і сьогодні серйозна увага повинна приділятися контролю за ІЛТ у птахогосподарствах, не дивлячись на широку програму вакцинації.

1.2 Збудник інфекційного ларинготрахеїту.

Вірус інфекційного ларинготрахеїту — це герпесвірус курей 1 серотипу (*Gallid herpesvirus 1* (GaHV-1), що належить до роду *Iltovirus*, підродини *Alphaherpesvirinae* з родини *Herpesviridae* (Davison et al., 2009). Генوم вірусу ІЛТ містить лінійну дволанцюгову ДНК розміром 150–155 kb, що кодує унікальну довгу (*UL*), унікальну коротку (*US*) та дві інвертовані повторні (*IR*) послідовності (McGeoch et al., 2000; Morales Ruiz et al., 2018; Lee et al., 2011).

Віріони ІЛТ під електронним мікроскопом виглядають як типові представники герпесвірусів, що складаються з ДНК всередині ікосаедричного капсиду, оточеного шаром глікопротеїнів зовнішньої оболонки (Roizman & Pellett, 2001). Розмір вірусної капсиди становить близько 100 нм в діаметрі, а повний розмір вірусних частинок знаходиться в межах від 200 до 350 нм (Granzow et al., 2001). Серед 80 ORF, шістдесят три ORF демонструють гомологію до геному вірусу звичайного герпесу-1 (HSV-1). Зовнішня оболонка містить глікопротеїни, а саме *gB*, *gC*, *gD*, *gE*, *gG*, *gH*, *gL*, *gI*, *gJ*, *gK*, *gL* і *gM*, які кодуються висококонсервативними ORF, а саме: *UL27*, *UL44*, *US6*, *US8*, *US4*, *UL22*, *US7*, *US5*, *UL53*, *UL1* та *UL10* відповідно (Piccirillo et al., 2016). Вірусні глікопротеїни важливі для реплікації вірусу ІЛТ та напрацювання гуморального та клітинного імунітету у господаря (Roizman & Pellett, 2001). Існує два кластери специфічних генів для *Iltovirus* — один розташований між *UL45* і *UL22*, та кодує п'ять ORF (*ORF A-E*), другий знаходиться між *UL-1* та *ICP4* та кодує *UL-0* та *UL-1*. Іншою відмінністю геному ІЛТ є відсутність *UL16* або його гомолога (Fuchs & Mettenleiter, 1996), а також локалізація *UL47* між генами *US3* та *US4* у ділянці *US*, замість того, щоб знаходитись в області *UL* і внутрішня інверсія збереженого гена скупчення в межах області *UL*. Дві області, позначені як *UL0* і *UL*, специфічні для геному вірусу ІЛТ, демонструють помітну схожість у амінокислотних послідовностях, що

свідчить про дублювання цієї ділянки гена під час еволюції вірусу (McGeoch et al., 1988).

Як і інші альфагерпесвіруси, геном вірусу ІЛТ містить три джерела реплікації ДНК, *OriL*, розташоване в області *UL*, і дві копії *OriS*, розташовані у внутрішніх регіонах повторного (*IR*) і термінального повтору (*TR*) (Lee et al., 2011). ORF відрізняються за своїми характеристиками від інших альфагерпесвірусів (McGeoch et al., 2006). Білки зовнішньої оболонки допомагають транспортувати капсид у цитоплазму і далі до ядра (Kelly et al., 2009).

Недавні досягнення молекулярних технологій дозволили ідентифікувати генетичні варіації вірусу ІЛТ. Секвенування нового покоління (*NGS*), у тому числі гібридне секвенування наступного покоління (*h-NGS*), виявилось корисним для виявлення мутацій у генах, пов'язаних з високою та низькою вірулентністю.

На основі секвенування вакцинних штамів з низьким та високим пасажним рівнем на курячих ембріонах та в культурах клітин встановлено, що реплікація та рекомбінація вірусів майже невіддільні, а отже, різноманітне потомство рекомбінантних вірусів ІЛТ з'являється за коінфекції у природних тварин–господарів (García et al., 2013).

На основі аналізу генотипування SNP TaqMan було виявлено 11 SNP в генах *UL*, *US5*, *US6*, *US7*, *US8*, *US9* та два SNP в генах *UL43* та *UL47*, що підтверджує високий рівень рекомбінації (Loncoman et al., 2017). Вірус ІЛТ, незалежно від типу, (аттенуйований штам або дикого типу), під час зараження цільового хазяїна, розмножується, набуває або повертає вірулентність, щоб викликати захворювання, та викликає приховану інфекцію.

Порівняння геному польових штамів збудника ІЛТ з різних країн, де активно використовуються комерційні вакцини, показало, що польові штами містили небагато амінокислот, подібних до вакцинних штамів. Це

означає, що польові штами могли походити від вакцинного штаму (Menendez et al., 2014).

1.3 Реплікація вірусу ІЛТ

Реплікація вірусу ІЛТ відбувається протягом першого тижня після інфікування (Bagust, 1986; Williams et al., 1992). Кон'юнктива, слизова оболонка носової порожнини та слизова оболонка трахеї є основними місцями реплікації вірусу ІЛТ, у результаті чого саме ураження цих тканин призводить до запалення, серозних або мукоїдних виділень та респіраторного синдрому (Corro et al., 2013a, 2013b), а також впливають на тяжкість та подальший перебіг інфекції (Beltrán et al., 2017). Також встановлено, що вірус ІЛТ може проникати у базальну мембрану слизової оболонки трахеї та кон'юнктиви (Reddy et al., 2014). У той же час епітеліальні клітини повітроносних мішків і легеней не завжди вражаються на первинних етапах реплікації вірусу (Saif et al., 2003). Вірус має здатність локалізуватися у трійчастому ганглії під час процесу одужання, в наслідок чого птиця стає латентним носієм збудника. Вірус здатний активуватися після того, як птахи-носії піддаються впливу стресовим факторам, таким як вакцинація, переміщення, початок несучості. Вірус ІЛТ виявлено в інших органах (мозок, язик, тимус, легені, серце, шлунок, підшлункова залоза, дванадцятипала кишка, тонка кишка, товста кишка, сліпі кишки, печінка, селезінка, нирки та бурса) інфікованої птиці на більш пізніх стадіях (Wang et al., 2013; Zhao et al., 2013), що може свідчити про те, що вірус ІЛТ здатен до системної реплікації.

Вакцинні та вірулентні штами вірусу ІЛТ можуть репродукуватися в клітинах курячих ембріонів, однак цитопатичний ефект (округлення клітин, утворення синцитію та відшарування клітин) виявляють у клітинах інфікованих вакцинними штамми та не спостерігають у клітинах, інфікованих польовими вірусами ІЛТ. Збільшення кількості вірусної нуклеїнової кислоти в клітині-хазяїні під час реплікації вірусу призводить

до накопичення більшої кількості вірусної ДНК, яка згодом включається до новоутворених вірусних частинок, розташованих всередині ядра клітини хазяїна. Це призводить до розвитку базofilних внутрішньоядерних тілець — включень, які можна виявити вже через 12 годин після зараження (Shahsavandi et al., 2017).

У природного хазяїна швидкість реплікації та ефективність передачі CEO адаптованих вірусів ІЛТ значно більша, ніж ТСО штамів, у результаті чого віруси, які є результатом реверсії CEO вакцинних штамів, викликають значно серйозніші ураження та більш серйозне захворювання з більшою загибеллю, ніж віруси, що походять від ТСО вакцинних штамів (García, 2017).

У цілому механізм реплікації вірусу ІЛТ є подібним до реплікації інших альфагерпесвірусів, наприклад вірусу простого герпесу *HSV-1*. Глікопротеїни оболонки вірусу, в основному *gC*, а меншій ступені *gB*, *gL*, *gH* та *gL* забезпечують приєднання до рецепторів клітин-господарів (Kingsley et al., 1994; Kingsley & Keeler Jr, 1999) і допомагають у злитті вірусної оболонки з клітиною господаря (Cardone et al., 2007; Trus et al., 2004). Високорегульована транскрипція та реплікація ДНК вірусу ІЛТ відбуваються в ядрі за допомогою механізмів клітин-хазяїв (Guo et al., 1993; Prideaux et al., 1992). Майже 70 кодованих вірусом білків регулюють реплікацію вірусної ДНК, яка включає кілька ферментів та білків, що зв'язують ДНК. Формування вірусного капсиду та упаковка ДНК завершується в кінці процесу реплікації вірусу в ядрі клітини-господаря. Нуклеокапсиди, що містять ДНК, отримують оболонку, виходячи з ядерної мембрани. Згодом віріони транспортуються в просвіт ендоплазматичної сітки, щоб набути другу оболонку і надалі накопичуватися в цитоплазматичних вакуолях (Guo et al., 1993). Віріони в цитоплазмі зв'язуються з білками оболонки та отримують додаткову оболонку в області комплексу Гольджі під час другого етапу збирання. Ці віріони дозрівають у цитоплазмі і вивільняються або екзоцитозом, або лізисом клітин (Guo et al.,

1993; Mettenleiter, 2002). Дослідження *in vitro* показали, що розвиток вірусних часток відбувається через 8–12 годин після зараження і досягає найвищої концентрації протягом 24–30 годин після зараження. Після успішної реплікації стадія латентності може тривати 7–10 днів після зараження (Bagust & Johnson, 1995). Іншою незвичайною ознакою, яка часто спостерігається під час реплікації вірусу ІЛТ, є утворення трубчастих структур та великих вакуолей, що містять віріони в зараженій цитоплазмі (Fuchs et al., 2007).

1.4. Антигенні властивості вірусу ІЛТ

Хоча штами вірусу ІЛТ є антигенно подібними між собою на основі різних досліджень (імунофлуоресцентних тестів, реакції нейтралізації), існує різниця у вірулентності, яка була продемонстрована в курячих ембріонах і в культурі клітин (Russell & Turner, 1983). Оболонкові глікопротеїни вірусу ІЛТ є потужними імуногенними білками, що здатні стимулювати гуморальний імунітет, а також опосередкований клітинний імунітет у курей (York & Fahey, 1990). Антигени вірусу ІЛТ, такі як глікопротеїни *gB*, *gC*, *gD*, *gE*, *gG*, *gH*, *gI*, *gJ*, *gK*, *gL* і *gM*, відіграють вирішальну роль у проникненні та реплікації вірусу (Goraya et al., 2017). Серед оболонкових глікопротеїнів виділяють глікопротеїн *G* (*gG*), який полегшує проникнення вірусу (Tran et al., 2000), а також поширення від клітин до клітин (Nakamichi et al., 2002). Глікопротеїн *gG* вірусу ІЛТ на ранніх стадіях зараження індукує вроджені імунні реакції (Devlin et al., 2010).

1.5 Фізико-хімічні властивості вірусу ІЛТ

Ураховуючи оболонкову структуру вірусу ІЛТ, його інфекційність значно залежить від органічних розчинників, таких як хлороформ, ефір та окислювачі, наприклад, H_2O_2 . Чутливість вірусу ІЛТ до температури значно відрізняється у різних штамів. У респіраторних ексудатах та трупах курей

вірус може зберігати інфекційність від 10 днів до 3 місяців за діапазону температур 13–23 °С. Вірус може виживати кілька місяців за температури 4 °С у збагачувальних середовищах, таких як поживний та гліцериновий бульйон. Попередні дослідження показали, що вірус втрачає інфекційність за прогрівання до 55 °С протягом 15 хвилин або за температури 38 °С протягом 48 годин, тоді як деякі штами стійкі до нагрівання. У глибокій підстилці вірус ІЛТ виживає протягом 3–20 днів за температури 11–24,5 °С, у посліді птиці за її утримання в кліткових батареях — протягом 3 днів за температури 11–19,5 °С і щонайменше протягом 3 тижнів у захоронених трупах птиці. Експериментальні дослідження показують, що життєздатність вірусу ІЛТ в підстилці зменшується під час її нагрівання до температури 38 °С протягом 24 годин або під час процесу компостування (Giambrone et al., 2008). Вірус швидко руйнується (<1 хв) загальноприйнятими дезінфікуючими засобами, такими як 3 % крезол, 5 % фенол або 1 % розчин гідроксиду натрію, однак наявність органічних речовин можуть суттєво впливати на ефективність дезінфікуючих засобів (Ruano et al., 2001).

1.6 Природні господарі вірусу ІЛТ

На відміну від інших альфагерпесвірусів, вірус ІЛТ має достатньо вузький діапазон природних господарів. Основним природним господарем вірусу ІЛТ є кури, однак інфікування також спостерігаються серед інших представників Курячих, таких як павичі, фазани, індики та цесарки (Crawshaw & Boycott, 1982). Хоча вважається, що качки є стійкими до інфікування ІЛТ, вони можуть виступати носіями (Yamada et al., 1980). Інші домашні та дикі птахи, такі як перепели, цесарки, голуби, шпаки, горобці, ворони та голуби, є стійкими до цієї хвороби.

1.7 Передача вірусу

Інфіковані птахи виділяють вірус з дихальних шляхів протягом 10 днів після зараження. Вірус ІЛТ потрапляє в організм хазяїна через дихальні

шляхи, очі та меншою мірою перорально. Пряма передача від птиці до птиці є назвичайно швидкою на відміну від латентної інфекції або носійства. У той же час не було виявлено вертикальної передачі вірусу. Також не спостерігається типової віремії при ІЛТ, хоча поширення вірусу до нереспіраторних органів інколи реєструється та обумовлене інфікованими лейкоцитами (Chang et al., 1973). Птахи-носії, які одужали після попередніх захворювань, також виступають джерелом зараження для чутливих неінфікованих птахів. Заражені птахи, птахи після клінічного одужання та латентні носії легко передають хворобу через виділення з роту (Hughes et al., 1987). Вірус потрапляє в стадо під час прямого контакту птиці з виділеннями з дихальних шляхів хворих або за рахунок непрямого контакту, механічної передачі (забруднене обладнання, підстилка, мішки для корму, пір'я, транспортні засоби, пил, взуття, одяг та пересування людей). Недавні дослідження показали, що вірус ІЛТ може зберігатися в біоплівках у системах водопостачання в пташниках та інфікувати сприйнятливих птахів (Ou et al., 2011). Деякі види комах можуть також виступати джерелом зараження птахів. Так, живий вірус ІЛТ був виявлений у деяких комах навіть через 42 дні після спалаху хвороби (Ou et al., 2012). Собаки та коти також можуть бути механічними переносниками вірусу. Доведеною є повітряна передача вірусу ІЛТ між комерційними пташниками під час їх роботи (Johnson et al., 2005).

1.8 Епізоотологічні дані хвороби

Уперше хворобу було зареєстровано у 1925 р. у США, а потім в Австралії, Великобританії та Європі (Cover, 1996). Спочатку захворювання мало назву пташина дифтерія. Назва інфекційний ларинготрахеїт була прийнята в 1931 році спеціальним комітетом з хвороб птиці Американської ветеринарної медичної асоціації (Guu, 2008). ІЛТ була першою вірусною хворобою птиці, для профілактики якої застосовували клоакальне введення (Gibbs, 1934).

На сьогоднішній день захворювання присутнє у більшості країн світу та є достатньо значимим. Повідомляється про спалахи хвороби в США (Dormitorio et al., 2013), Канаді (Ojkic et al., 2006), Бразилії (Parra et al., 2015), Європі (Neff et al., 2008), Австралії (Agnew-Crumpton et al., 2016), Китаї (Zhuang et al., 2014), Єгипті (Magouz et al., 2018) та Південній Азії (Gowthaman et al., 2014). Протягом 2000–2013 рр. захворювання реєстрували щонайменше у 100 країнах (Menendez et al., 2014). Нещодавно наявність вірусу ІЛТ було підтверджено молекулярними методами в Іраку, що було першим випадком у цій країні (Alaraji et al., 2019). У 2018 році було зареєстровано три спалахи ІЛТ у Намібії, що спричинило величезну смертність серед бройлерів комерційних стад (Molini et al., 2019). Захворювання присутнє в кількох азійських (Китай, Індія, Японія, Ліван, М'янма, Філіппіни, Тайвань), африканських (Камерун, Уганда, Намібія, Єгипет, Нігерія), американських (Канада, США, Коста-Ріка, Аргентина, Бразилія, Чилі, Перу, Уругвай), європейських (Австрія, Бельгія, Данія, Німеччина, Італія, Молдова, Норвегія, Нідерланди, Польща, Швеція, Швейцарія та Великобританія) країнах та країнах Океанії (Австралія, Острови Кука, Французька Полінезія, Гуам, Нова Зеландія (OIE Disease Information, 2014; Magouz et al., 2018; Alaraji et al., 2019; Molini et al., 2019; Hidalgo, 2003; Chacón & Ferreira, 2009).

Тенденція до високої щільності посадки, скорочення перерв між виробничими циклами, вирощування птиці різних напрямків (бройлери, промислова несучка, батьківські стада) у межах однієї географічної області, а також неправильна вакцинація та порушення біозахисту сприяли збільшенню спалахів ІЛТ у всьому світі (Blakey et al. 2019; García et al., 2013). ІЛТ залишається серйозною загрозою і негативно впливає на птахівничу галузь у всьому світі з часу її появи в середині 1920-х років. Птахи різного віку, починаючи з восьми днів і до чотирьох років, сприйнятливі до зараження вірусом ІЛТ, хоча найбільш чутливими є у віці понад три тижні (Dufour-Zavala, 2008b). Захворюваність та смертність

варіюють залежно від вірулентності циркулюючих польових штамів вірусу ІЛТ (Devlin et al., 2006), (Oldoni et al., 2009), вірусного навантаження та паралельних інфекцій іншими респіраторними патогенами (Guy, 2008). Супутні респіраторні захворювання, такі як *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, інфекційний риніт, інші імуносупресивні захворювання, такі як мікотоксикози, вірусна анемія курей, вірусний ретикулоендотеліоз, хвороба Марека посилюють перебіг ІЛТ (Zavala, 2011). Спорадичні випадки ІЛТ можуть траплятися в неякісно вакцинованих стадах або через помилки у застосуванні вакцин. У господарствах з різновіковою птицею є ризик виникнення захворювання у курей старшого віку під час посадки молодших вакцинованих стад (Hidalgo, 2003). Важка форма характеризується швидким поширенням із високою захворюваністю (90–100 %) або коливаннями смертності від 5 до 70 % (у середньому 10–20 %). Легка форма характеризується низькою захворюваністю (<5 %) і дуже низькою смертністю (0,1–2 %). Вакцинні та польові штами вірусу ІЛТ еволюціонують у високовірулентні штами в районах вирощування птиці з високою щільністю посадки завдяки існуванню безперервного резервуару, згодом ті самі віруси закріплюються на певних територіях та постійно викликають спалахи (Guy et al., 1990; Kotiw et al., 1995). Господарства, де спостерігається висока щільність посадки птиці, часто зазнають величезних економічних втрат із загальною смертністю, що досягає 70 % (Bagust et al., 2000).

Як і інші герпесвіруси, вірус ІЛТ може перебувати у латентному стані в трійчастому ганглії центральної нервової системи через 7 днів після завершення гострої інфекції (Hughes et al., 1991; Williams et al., 1992). У подальшому вірус може активуватися внаслідок стресових ситуацій, таких як переміщення птахів, початку несучості (Hughes et al., 1989). У цілому, такі непомічені спорадичні випадки активації латентного вірусу можуть призводити до подальшої активної репродукції його в клітинах трахеї та подальшій передачі сприйнятливим птахам (Bagust & Johnson,

1995; Roy et al., 2015). Птахи з присадибних господарств також відіграють важливу роль як джерело інфекції для комерційних птахівничих господарств, у тому числі і через латентну інфекцію у птахів з присадибних господарств (Ojkić et al., 2006; Neff et al., 2008; Kirkpatrick et al., 2006). Дослідження також виявляють високу серопозитивність до вірусу ІЛТ (72 %) у невакцинованих стадах, що також додатково свідчить про роль птахів з присадибних господарств у поширенні захворювання (Hernandez-Divers et al., 2008).

1.9 Патогенез

Основним шляхом передачі вірусу ІЛТ є повітряно-краплинний. Початкова реплікація вірусу ІЛТ відбувається в епітелії кон'юнктиви, дихальних пазух, гортані та слизовій оболонці верхніх дихальних шляхів (Guy, 2008). У місцях первинної реплікації титр вірусу досягає максимуму між 4 та 6 днями після інфікування, а також може бути виявлений у місцях латентної інфекції в трійчастих гангліях (Bagust, 1986; Kirkpatrick et al., 2006; Oldoni et al., 2009). Активна цитолітична інфекція призводить до серйозного пошкодження трахеї та кон'юнктивальної епітеліальної оболонки, що призводить до кровотеч та інших клініко-патологічних проявів у птахів (Tully, 1995). Потім вірус ІЛТ поширюється на власну епітеліальну пластину через базальну мембрану за допомогою клітинних протеаз (Reddy et al., 2014; Steukers et al., 2012), досягає печінки, мигдаликів сліпої кишки та клоаки (Bagust, 1986; Oldoni et al., 2009). Однак повністю механізм розповсюдження вірусу в організмі залишається не з'ясованим. Найвищі титри вірусу були виявлені в тканинах трахеї протягом 4–6 днів після інфікування і залишались в трахеальних секретах від 6 до 10 днів після зараження (Purcell & McFerran, 1969; Hitchner et al., 1977; Robertson & Egerton, 1981).

1.10 Клінічні ознаки

Інкубаційний період ІЛТ коливається від 6 до 14 днів. Виділення вірусу в навколишнє середовище починається через 2 дні після зараження та за 4 дні до появи клінічних ознак (Davison et al., 1989). Клінічний перебіг ІЛТ реєструється у птиці від 11 днів до 6 тижнів залежно від форми захворювання (McMullin, 2004). Клінічні ознаки характеризуються раптовим збільшенням середньодобової смертності (Aziz, 2010). На тяжкість захворювання впливають вірулентність вірусу, стресові умови, супутні інфекції іншими патогенами, імунний статус та вік птиці (Vasudevan et al., 2016). Інфекція характеризується надгострою, гострою та хронічною формами ІЛТ.

Надгостра форма. Характеризується раптовим початком, швидким розповсюдженням та високою смертністю, яка може перевищувати 50 % (OIE Disease Information, 2014). Уражена птиця стає млявою, часто спостерігається кон'юнктивіт від середнього до важкого ступеня із набряком повік та посиленою сльозотечею. Іноді загибель птиці реєструється без будь-яких клінічних ознак (Preis et al., 2013). Під час хвороби у птиці спостерігається задуха. Кашель, хрипи також помічаються, коли птахи намагаються видалити згортки крові та фібрин із закупореної трахеї (Blakey et al., 2019; Guy et al., 1990). Зазвичай уражені птахи гинуть протягом 3 днів (Cover, 1996).

Гостра форма. Для цієї форми характерна задуха, але початок захворювання не є раптовим або важким, як при надгострій формі. Спочатку уражені птахи стають неактивними, малорухливими, відмовляються від їжі (Guy, 2008). Температура тіла підвищується між 4 і 6 днями після інфікування, а кількість лейкоцитів демонструє легку та помітну лімфопенію та гетерофілію (Chang et al., 1997). Обструкція трахеї кров'яними згустками та ексудатами призводить до тривалої задишки з відкритим дзьобом, важкого дихання, хрипів. В уражених курей може також виявлятися гнійний кон'юнктивіт із пінистим ексудатом, синусит та

виділення з носа. Захворюваність може досягати 100 %, смертність коливається від 10 до 30 %, може тривати до 15 днів. Що стосується репродуктивних стад — може спостерігатись повне припинення несучості, яке з часом може відновитись до нормального рівня.

Хронічна форма. Ця форма нагадує інші респіраторні інфекції, що характеризуються кволістю, кашлем, вологими хрипами, тремтінням голови, закриванням очей, набряком підочної пазухи, зниженням несучості (до 10 %) та маси тіла (Ou & Giambrone, 2012). Захворюваність може сягати 5 %, а смертність, як правило, обмежена <2 % (Bagust et al., 2000).

1.11 Патологоанатомічні зміни

Патологоанатомічні зміни, як правило, обмежені пазухами і верхніми дихальними шляхами і змінюються залежно від тяжкості захворювання. Патологоанатомічні зміни за надгострої форми складаються з мукоїдного риніту та геморагічного трахеїту зі згортками крові (Guy, 2008; Barhoom & Dalab, 2012). Жовті казеозні екsudати також спостерігаються в первинних бронхах (*OIE Disease Information*, 2014). У гострій формі зазвичай спостерігаються жовті казеозні дифтеритичні мембрани, що прилягають до гортані та слизової оболонки верхньої трахеї з крововиливами або без них (Gowthaman et al., 2014). Мембрана також утворює обструктивні пробки в області гортані та глотки, що призводить до задухи та смерті. Набряк слизової оболонки з дифтерійним ексудатом або без нього може спостерігатись в просвіті трахеї за хронічної або легкої форми ІЛТ (Linares et al., 1994). Також можна помітити фібринозні плівки, що прилипають до слизової оболонки верхніх дихальних шляхів (Russell, 1983; Russell & Turner, 1983). Окрім ураження трахеї, спостерігається кон'юнктивіт, набряки та застійні явища зі збільшенням очних виділень (Kirkpatrick et al., 2006). Ураження легень і повітроносних мішків зустрічаються рідко. Однак іноді спостерігають застій у легенях і потовщення повітряних мішків з казеозними ексудатами в просвіті (Aziz, 2010). У випадку супутніх інфекцій

реєстрували риніт слизово-фібринозного характеру та синусит, закупорку навколоносових пазух казеозним ексудатом, набряк голови та слизово-фібринозний трахеїт (Couto et al., 2015). У літературі описано поодинокий випадок важкого ерозивного езофагіту та фарингіту, що супроводжувався дегенерацією епітелію, некрозом та утворенням синцитію з внутрішньоядерними тільцями-включеннями, що вважається нетиповою формою ІЛТ (Sary et al., 2017).

Мікроскопічні ураження в основному обмежені кон'юнктивою, носовими пазухами, трахеєю та легеньми (Linares et al., 1994). У кон'юнктиві вони складаються з гіперемії, набряку, інфільтрації клітин з подальшим ураженням епітелію. Це також призводить до розшарування епітелію кон'юнктиви з накопиченням ексудатів, що містять переважно еритроцити та лейкоцити (Aziz, 2010). Спочатку мікроскопічні зміни в трахеї характеризуються інфільтрацією клітин. Інфіковані епітеліальні клітини зазнають гіперпластичних змін, за якими слідують лімфоцитарні та гістіоцитарні інфільтрації у слизовій та підслизовій оболонках (Russell, 1983). Згодом клітини епітелію трахеї піддаються некрозу з дифузним оголенням підслизової оболонки, що призводить до випинання і розриву кровоносних судин в просвіт трахеї, що призводить до тяжкого ларингіту та трахеїту (Sary et al., 2017). Внутрішньоядерні базофільні або еозинофільні тільця-включення, оточені ореолом, зазвичай спостерігаються на початкових стадіях зараження (1–5 днів), і пізніше зникають внаслідок некрозу та руйнування епітеліальних клітин (Guy et al., 1992, VanderKop, 1993). На цій стадії просвіт трахеї містить різну кількість ексудатів з фібрином, запальних клітин, еритроцитів, уламків епітелію та синцитіальних клітин з внутрішньоядерними тільцями-включеннями або без них (Hayashi et al., 1985). Регенерація починається через шість днів після інфікування, коли проліферація решти базальних клітин у птахів переживає гостру фазу (Bagust et al., 2000). Підгострий гіперпластичний трахеїт, що характеризується проліферацією кількох шарів регенеруючих,

недиференційованих епітеліальних клітин, що вистилають слизову і слизові залози, стає очевидним на етапі загоєння. Гістопатологічні зміни в первинних і вторинних бронхах характеризуються дегенерацією епітелію та з інфільтрацією мононуклеарних клітин (Preis et al., 2013). Синцитіальні клітини з внутрішньоядерними тільцями-включеннями також можна побачити в місцях ураження (Timurkaan et al., 2003).

1.12 Методи діагностики ІЛТ

У попередні роки, коли захворювання тільки почало поширюватися в промисловому птахівництві, діагностика і не викликала труднощів, особливо враховуючи наявність типової клінічної та патологоанатомічної картини у птиці. Навіть за умови чіткої клінічної та патологоанатомічної картини, лабораторне підтвердження завжди було обов'язковим. Але, на сьогодні, враховуючи багато факторів, таких як імунний прес, вакцинації, інтенсифіковані технології промислового птахівництва, наявність супутніх вірусних та бактеріальних ко-інфекцій тощо захворювання на ІЛТ протікає нетипово, без чіткої клінічної картини та патологоанатомічних змін. Таким чином вирішальне значення лабораторної діагностики тільки підвищилося. На сьогоднішній день усі існуючі методи лабораторної діагностики ІЛТ можна розділити на традиційні та новітні. До традиційних належать патогістологічні дослідження, виділення вірусу за допомогою курячих ембріонів чи культури клітин, імунофлуоресцентний метод виявлення антигену, а також низка серологічних реакцій (ІФА, РДП) (García et al., 2013; Timurkaan et al., 2003; Wilks & Kogan, 1979; Hughes & Jones, 1988; Humberd et al., 2002; Srinivasan et al., 2012; García & Riblet, 2001; Chang et al., 1977; McNulty et al., 1985; Schnitzlein et al., 1995). Для детекції вірусу можуть використовуватися імуногістохімічні методи (Ide, 1978).

Для виявлення антитіл та диференціації деяких вірусів Fukui D. et al. використовували РДП в агаровому гелі (Fukui et al., 2016). Однак чутливість була нижчою в порівнянні з іншими серологічними методами (реакція

нейтралізації (Devlin et al., 2011), тест непрямой імунофлюоресценції та ІФА (Godoy et al., 2013). ІФА є золотим стандартом для виявлення антитіл до вірусу ІЛТ (Kumar et al., 2019). Хоча звичайні методи є економічно ефективними і широко застосовуються в діагностичних лабораторіях, ці методи мають деякі обмеження, такі як низька чутливість, трудомісткість. На сьогодні основний метод діагностики ІЛТ — це варіації молекулярних методів, таких як ПЛР, ПЛР у реальному часі, гніздова ПЛР, рестрикційний аналіз (*RFLP*), гібридизація *in situ*, тощо через їх високу чутливість, точність, швидкість, відтворюваність та простоту (Nielsen et al., 1998; Vögtlin et al., 1999; Creelan et al., 2006; Callison et al., 2007; Mahmoudian et al., 2011; Davidson et al., 2015; Santander Parra et al., 2018). Хоча ці молекулярні методи мають значну діагностичну цінність, вони не розрізняють віріони, які здатні викликати захворювання, від тих, що не здатні його викликати (Menendez et al., 2014). Раніше польові та вакцинні штами ІЛТ були диференційовані на основі рестрикційного аналізу (*RFLP*) (Kotiw et al., 1995; Leib et al., 1986; Andreasen et al., 1990; Keeler Jr et al., 1993; Oldoni & García, 2007; Craig et al., 2017), але розвиток молекулярних технологій та новітні платформи секвенування дозволяють більш швидко та ефективно ідентифікувати мутації у генах, пов'язаних із високою та низькою вірулентністю (Spatz et al., 2019).

Таким чином, провівши аналіз ситуації та узагальнюючи наведені вище дані щодо інфекційного ларинготрахеїту ІЛТ в світі, стану вакцинопрофілактики цього захворювання, особливостей прояву захворювання у вакцинованої та невакцинованої птиці, умов підтримання циркуляції збудника, появи патогенних варіантів, а також стану серологічної діагностики, ми дійшли до висновку про важливість вивчення епізоотичної ситуації щодо ІЛТ в Україні та дослідження, які ізоляти циркулюють у промислових та присадибних птахівничих господарствах у нашій країні, а також вдосконалити серологічну діагностику за рахунок розробки вітчизняної тест-системи для виявлення специфічних антитіл до вірусу ІЛТ у курей.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Робота виконана у відділі хвороб птиці та молекулярної діагностики Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», а також у промислових та присадибних птахівничих господарствах Харківської, Черкаської, Донецької, Хмельницької, Луганської, Херсонської областей України у період 2017–2024 років. У роботі також було використано дані лабораторних досліджень, проведених у період 2010–2017 років у відділі вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ».

2.1 Відбір матеріалу

Сироватки крові для серологічних досліджень були отримані від курей (несучок, бройлерів, батьківського поголів'я) різного віку з промислових та присадибних птахівничих господарств з виробництва яєць та м'яса птиці з Харківської, Черкаської, Донецької, Хмельницької, Луганської, Херсонської областей України в рамках постійного епізоотичного моніторингу інфекційних захворювань птиці, що проводиться в ННЦ «ІЕКВМ». Крім того, для проведення досліджень з виявлення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту курей були використані архівні сироватки крові з різних регіонів України, отримані в період 2010–2017 років, які зберігалися в замороженому стані у відділі вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ».

Зразки патологічного матеріалу від загиблих та хворих курей із респіраторними ознаками та підозрою на захворювання інфекційним ларинготрахеїтом відбиралися в Сумській області. Для проведення досліджень у рамках виконання дисертаційної роботи здобувач використовував архівні дані відділу вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ»,

у тому числі результати серологічного моніторингу ІЛТ, епізоотологічні дані цих господарств, архівні фото клінічної картини, розтину та патологоанатомічних змін. Також для вірусологічних досліджень було використано архівний патологічний матеріал від хворих та загинувших курей, який зберігався в архіві відділу вивчення хвороб птиці в замороженому стані за температури мінус 70 °С.

2.2 Серологічні дослідження

Наявність антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту визначали у сироватках крові курей. Сироватки крові від дорослих курей та молодняку курей отримували з підкрильцевої вени за загальноприйнятими методиками (Dufour-Zavala, 2008a).

Виявлення антитіл до вірусу грипу проводили за допомогою ІФА з використанням комерційної тест-системи Civtest AVI ILT (Іспанія) та Biocheck ILT ELISA (Великобританія) відповідно до інструкції виробника та експериментально-розробленої тест-системи «Набір компонентів для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом» (ННЦ «ІЕКВМ»).

Постановку ІФА та інтерпретацію отриманих результатів проводили у відповідності до настанови виробника, а також у відповідності до власних розробок, зроблених в рамках виконання цієї дисертаційної роботи.

2.3. Вірусологічні дослідження

Вірусологічні дослідження, спрямовані на виділення вірусу інфекційного ларинготрахеїту з патологічного матеріалу від курей, були проведені у відділі хвороб птиці та молекулярної діагностики ННЦ «ІЕКВМ». Для цього використовували внутрішні органи (трахея, глотка, гортань, бронхи, легені, селезінка) від загинувших та вимушено забитих курей з респіраторними розладами.

Відбір патологічного матеріалу проводили згідно загальноприйнятих методик (Dufour-Zavala, 2008a; OIE, 2008). Відібраний патологічний матеріал заморожували негайно за температури мінус 70 °C. У разі проведення розтину за межами лабораторії зразки патологічного матеріалу поміщали у гліцеринове транспортне середовище з антибіотиками з наступним заморожуванням у рідкому азоті за температури мінус (196±2) °C. Транспортування проб проводили в рідкому азоті відповідно до міжнародних правил транспортування інфекційних матеріалів (UNECE, 2003).

Підготовка біологічного матеріалу до досліджень. Зразки патологічного матеріалу гомогенізували за допомогою пристрою Beadbug microtube homogenizer D1030-E та готували (10–20) % суспензію на фосфатно-сольовому буфері (ФСБ, рН $7,2 \pm 0,1$) з антибіотиками (пеніцилін — 2000 ОД/см³, стрептоміцин — 2000 мкг/см³, гентаміцин — 0,05 мг/см³, ністатин — 1000 ОД/см³), витримували 2–4 год за температури ($4 \pm 0,5$)°C, після чого освітлювали центрифугуванням при (800–1000) g упродовж 10 хв та використовували для зараження КЕ (Dufour-Zavala, 2008a; OIE, 2008).

Ізолювання вірусу на курячих ембріонах. Для вірусологічних досліджень використовували КЕ, які були отримані від курей, не вакцинованих проти інфекційного ларинготрахеїту, вільних від антитіл до ІЛТ з господарств, благополучних щодо інфекційних захворювань.

Надосадовою рідиною, отриманою після центрифугування, інфікували 11–13-добові КЕ в дозі (0,1–0,2) см³ на хоріоалантоїсну оболонку (ХАО). Інфіковані ембріони інкубували за температури ($37 \pm 0,5$)°C до 7 діб. Загиблих ембріонів, а також тих, що не загинули протягом періоду спостереження після охолодження, піддавали розтину, відбору екстраембріональної рідини (ЕЕР) та хоріоалантоїсної оболонки. ЕЕР перевіряли на наявність гемаглютинінів у РГА та додатково на відсутність контамінації сторонньою мікрофлорою за ДСТУ 4483:2005

(Держспоживстандарт України, 2006). За вірусологічних досліджень проводили не менше трьох «сліпих» пасажів. РГА з екстраембріональною рідиною проводили за методикою, рекомендованою WOAH (Dufour-Zavala, 2008a; OIE, 2008). За розтину ембріонів після інфікування звертали увагу на стан ХАО, наявність потовщень оболонки, її набряку та інших патологоанатомічних змін.

Визначення біологічної активності. Дослідження біологічної активності (визначення титру) вірусів ІЛТ проводили на 11–13-добових курячих ембріонах. Титрування вірусів проводили за загальноприйнятою методикою з використанням десятикратних розведень вірусвміщуючого матеріалу. Титр біологічної активності вірусу виражали в ЕІД₅₀/0,1 см³ (інфекційний титр), у ЕЛД₅₀/0,1 см³ (летальний титр). Розрахунок титру здійснювали за методом Ріда та Менча (Dufour-Zavala, 2008a; OIE, 2008).

Накопичення вірусу інфекційного ларинготрахеїту. Ізоляти вірусу ІЛТ для накопичення вірусної сировини культивували на 11–13-добових курячих ембріонах, отриманих з господарств, благополучних щодо інфекційних захворювань курей і вільних від специфічних антитіл до вірусу ІЛТ. КЕ інфікували на ХАО в дозі 0,2 см³. Розведення вірусів готували на ФСБ рН (7,2–7,4) з додаванням антибіотиків й витримували за кімнатної температури протягом 30 хвилин. Ембріони інкубували протягом 5 діб за температури 37 °С та піддавали овоскопії двічі на добу, загибель ембріонів протягом першої доби вважали неспецифічною. Після охолодження КЕ проводили їхній розтин.

Інактивація вірусу ІЛТ. Для інактивації використовували суміш екстраембріональної рідини, а також суспензію ХАО інфікованих курячих ембріонів. Перед процедурою інактивації рідину звільняли від великих часток шляхом центрифугування за 2 000 об./хв протягом 10 хвилин за температури 4°С. Після центрифугування для подальшої роботи використовували надосадову рідину. Інактивацію сировини проводили формальдегідом в кінцевій концентрації 0,5 % за методиками, які

рекомендовані WOAH (OIE, 2008). Перевірку повноти інактивації вірусів проводили шляхом трьох послідовних «сліпих» пасажів на 11–13-добових КЕ.

2.4 Молекулярно-генетичні дослідження

Молекулярно-генетичні дослідження проводили у відділі молекулярної епізоотології та діагностики ННЦ «ІЕКВМ», в Національному ветеринарному інституті (Пулави, Польща) та лабораторії Royal GD (Deventer, The Netherlands). Секвенування ділянки геному тімідін-кінази вірусу ІЛТ проводили в Національному ветеринарному інституті (Пулави, Польща).

Полімеразна ланцюгова реакція. Для виявлення ДНК вірусу ІЛТ була використана класична ПЛР, для контролю контамінації іншими вірусами також застосовували ПЛР зі зворотною транскрипцією. Для екстракції сумарної нуклеотидної кислоти застосовували комерційні набори виробництва Jena Analytik (Німеччина). Для зворотної транскрипції використовували набори High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit виробництва Applied Biosystems (США). Реакцію ампліфікації проводили за допомогою наборів DreamTaq PCR Master Mix, Applied Biosystems «Fermentas» (Латвія). Постановку ПЛР проводили відповідно до раніше описаних методик. Ділянку розміром приблизно 224 п. н. гена тімідин-кінази вірусу ІЛТ було ампліфіковано з використанням праймерів: F(5'-CTGGGC-TAA-ATC-ATC-CAA-GAC-ATC-A-3') та R (5'-GCT-CTC-TCG-AGT-AAGAAT-GAG-TAC-A-3') (Mahmoudian et al., 2011).

Для контролю якості вірусної сировини та відсутності її контамінації іншими збудниками вірусних хвороб птиці були використані стандартні методики та специфічні олігонуклеотиди: *MuR/MuF* — для виключення вірусу хвороби Марека, *HexF1/HexR1* — аденовірусів птиці (Marek et al., 2010), універсальний праймер *G5-* та типоспецифічні праймери *G8+,G9+* — метапневмовірусу птиці (Falchieri et al., 2012), *VP2_F/VP2_R* — вірусу

хвороби Гамборо (Zierenberg et al., 2000), *UTR 1/2* — для виключення наявності генетичного матеріалу вірусу інфекційного бронхіту курей (Adzhar et al., 1996). Електрофоретичний аналіз проводили у 2 % агарозному гелі в ТЕ-буфері (120 В, 40 хв), візуалізацію — за допомогою етидіуму броміду в УФ-спектрі.

Належність до польового типу чи вакциноподібних ізолятів ІЛТ була визначена в лабораторії Royal GD (Deventer, The Netherlands) методом рестрикційного аналізу відповідно до рекомендацій WOAH (OIE, 2008) і внутрішніх СОП лабораторії Royal GD.

Секвенування та філогенетичний аналіз. Ділянку розміром 522 п. н. гена *US8*, який кодує оболонковий глікопротеїн Е вірусу інфекційного ларинготрахеїту, було ампліфіковано з використанням специфічних праймерів та набору Invitrogen Superscript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Амплікони були секвеновані за технологією Сенгера у Національному ветеринарному інституті (Пулави, Польща). Множинне вирівнювання здійснювали за допомогою програми ClustalW (Mega X), побудова філогенетичного дерева — у програмі Mega X. Еволюційний аналіз проведено за допомогою методу максимальної правдоподібності у програмі MEGA X (Kumar et al., 2018). Для проведення філогенетичних досліджень вірусу ІЛТ були використані відкриті бази даних GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.5 Ізоляти вірусу ІЛТ, які використані в роботі

Під час проведення наукових досліджень у рамках дисертаційної роботи були використані 7 польових ізолятів вірусу ІЛТ (табл. 2.1). Усі польові ізоляти зберігали в замороженому стані за температури мінус 70 °С. Напрацювання вірусної сировини проводили на 9–11-добових комерційних КЕ, отриманих із господарств, благополучних щодо інфекційних захворювань.

Таблиця 2.1 — Список ізолятів вірусу ІЛТ, які були використані в дослідженнях

Назва ізоляту	Розташування господарства	Рік	Вік птиці, напрямок продуктивності
Б 2-10	Господарство 1 Харківська обл.	2010	180 діб, несучки
ЧП 96-10	Господарство 2 Луганська обл.	2010	125–433 діб, несучки
В 59-11	Господарство 3 Харківська обл.	2011	120 діб, м'ясо-яєчні
Х 2-12	Господарство 4 Харківська обл.	2012	189–193 діб, несучки, крос Хай Лайн білий
А 04-12	Господарство 6 Донецька обл.	2012	138 діб, несучки, крос Декалб білий
Суми/6-11/19	Господарство 7 Сумська обл.	2019	130 діб, несучки

2.6 Дослідні тварини

Для біопроби були використані курчата 60-добового віку кросу Бірківська барвіста, які не були вакциновані проти вірусу ІЛТ та не мали антитіл до нього. Курчат інфікували інтратрахеально. Для інфікування використовували 10 %-ну суспензію патматеріалу від загиблої птиці (група 1) та екстраембріональну рідину інфікованих курячих ембріонів (група 2) в дозі $5,0 \lg \text{EID}_{50}/0,1 \text{ см}^3$. Після інфікування за птицею спостерігали протягом 15 діб.

2.7 Гістологічні дослідження

Гістологічні дослідження були проведені за участі співробітників лабораторії патоморфології ННЦ «ІЕКВМ», вивчали гістопрепарати з внутрішніх органів щодо впливу вірусу ІЛТ на структуру тканин. Зрізи готували з парафінових блоків, забарвлених за методом Браше (метиловим зеленим та піроніном G) гематоксиліном та еозином. У зрізах визначали гістологічну структуру та клітинний склад органів, тип основних складових клітин, оцінювали характер, розповсюдження патологічних та інволютивних

проявів, довжину складових клітин, їхню конфігурацію, густину епітеліального та ступінь розвитку поверхневого мозкового шарів.

Гістоморфологічні зміни вивчали в процесі мікроскопії мазків із застосуванням мікроскопу Axioskop 40 FL (Carl Zeiss Jene GmbH, Німеччина) (Noll & Schaub-Kuhnen, 2000).

2.8 Реактиви та матеріали для ІФА

Матеріали для ІФА. Сироватки крові курей — референтні (панель гетерологічних сироваток для визначення специфічності набору), нормальні та від хворої або вакцинованої птиці; кон'югат антивидовий імунопероксидазний проти Ig G курей виробництва KPL (США); АБТС (2,2'-азіно-ди(3-бензтіазолінсульфонова кислота)) з перекисом водню виробництва SIGMA-ALDRICH (Німеччина); полістиролові мікропланшети для ІФА MaxiSorb, NUNK (Данія); реактиви для приготування буферних розчинів різних виробників (натрій фосфорнокислий двозаміщений 12-водний, натрій фосфорнокислий однозаміщений 2-водний, натрій хлористий, карбонат натрію, гідрокарбонат натрію, лимонна кислота, тріс(оксіметил)амінометан, тріс(оксіметил)амінометан гідрохлорид, сірчана кислота, ЕДТА); детергент твін-20; консерванти (азид натрію, мертіюлят натрію); інші хімічні реактиви (бичачий сироватковий альбумін, пероксидаза хрому, перекис водню, поліакріламід, бісакріламід, додецилсульфат натрію (ДСН), сульфат амонію, персульфат амонію, N,N,N',N' тетраметіл-етілен-діамін (ТЕМЕД); Coomassie Blue G 250, гліцерин, етанол, поліетиленгліколь-115, сахароза, фосфорно-вольфрамова кислота, хлороформ).

Розчини для постановки ІФА. Для сенсibiliзації планшетів використовували 0,1М карбонатно-бікарбонатний буфер рН 9,6. Для розведення компонентів тест-системи та міжетапних промивань використовували тріс-НСl буфер (0,05М тріс-НСl + 0,2М NaCl рН 7,2–7,4), який готували з двох компонентів (розчин 1 (1М тріс-НСl (рН 7,2–7,4) та

розчин 2 (2,5М NaCl). Для виготовлення буферного розчину 0,05М тріс-HCl + 0,2М NaCl рН 7,2–7,4 використовували: розчин 1 (1М тріс-HCl) — 50,0 см³, розчин 2 (2,5М NaCl) — 80,0 см³, вода дистильована — до 1000 см³. Перед використанням додавали 0,1 % детергенту твін-20 (1 см³ твіну-20 на 1000 см³ буферного розчину).

Приготування специфічних компонентів для ІФА. Оптимальні режими очищення та концентрування антигену вірусу ІЛТ підібрано експериментально. Визначення кінцевої концентрації білка в антигенах вірусу ІЛТ після очищення проводили за методикою Бредфорда (Bradford, 1976). Специфічні сироватки крові курей, що використовувались як позитивний контроль у тест-системі для визначення антитіл до вірусу ІЛТ, отримували шляхом імунізації інактивованим очищеним антигеном курчат 30-добового віку, які були вільні від материнських антитіл. Контрольну негативну сироватку (вільну від антитіл до ІЛТ) отримували від інтактних курчат, отриманих з благополучного щодо інфекційних захворювань птиці господарства. Під час створення виробничої панелі сироваток до вірусу ІЛТ використовували зразки сироваток крові курей без ознак бактеріального забруднення, протестовані в ІФА.

Відпрацювання оптимальних співвідношень компонентів для постановки ІФА. Оптимальні умови постановки реакції визначали експериментально. Визначення робочих розведень антигену ІЛТ, імунопероксидазного кон'югату проти Ig G курей, дослідних сироваток і відпрацювання методики постановки реакції ІФА здійснювали згідно з рекомендаціями (Crowther, 2000; Hnasko, 2015; Karaszkievicz, 2005). Для досліджень також були використані референтні позитивні сироватки крові до вірусу інфекційного бронхіту курей, ньюкаслської хвороби, високопатогенного грипу птиці, інфекційної бурсальної хвороби, метапневмовірусу, вірусу інфекційного енцефаломієліту, аденовірусу 4 серотипу, виробництва Royal GD (Нідерланди).

2.9 Статистична обробка.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з визначенням критеріїв вірогідності за Стьюдентом. Для статистичної обробки даних використовували комп'ютерні програми Statsoft Statistica: Basic Statistics and Tables 6.0 і Microsoft Excel XP.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Епізоотологічний моніторинг інфекційного ларинготрахеїту курей в Україні

3.1.1 Аналіз даних серологічного моніторингу інфекційного ларинготрахеїту в промислових господарствах в період 2010–2017 років.

На першому етапі наших досліджень ми провели аналіз результатів лабораторних досліджень сироваток крові курей з промислових птахівничих господарств, які були проведені у відділі вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» в 2010–2017 роках. У цей період у відділ вивчення хвороб птиці було доставлено сироватки крові з 14 птахівничих господарств 6-ти областей України (Харківської, Черкаської, Донецької, Хмельницької, Луганської, Херсонської). Узагальнені результати лабораторних досліджень наведені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 — Результати серологічних досліджень щодо наявності антитіл до інфекційного ларинготрахеїту у курей у 2010–2017 рр.

з/п	Назва підприємства	Кількість досліджених проб	Кількість позитивних проб	% позитивних проб
1	2	3	4	5
2010 р.				
1	Господарство Бор Харківська обл.	26	26	100
2	Господарство ПТ Черкаська обл.	325	276	84,9
3	Господарство Вар Донецька обл.	19	2	10,5
4	Господарство БП Харківська обл.	50	0	0
5	Господарство Ав Хмельницька обл.	50	2	4,0
6	Господарство ВП Донецька обл.	40	2	5,0

Продовження таблиці 3.1

1	2	3	4	5
7	Господарство ЧП Луганська обл.	100	22	22,0
8	Господарство З Харківська обл.	50	18	36,0
9	Господарство З Харківська обл.	50	35	70,0
2011 р.				
10	Господарство Прол Донецька обл.	12	5	41,7
11	Господарство ЧП Луганська обл.	20	13	65,0
12	Господарство Ав Хмельницька обл.	20	9	45,0
13	Господарство ПТ Черкаська обл.	20	12	70,0
14	Господарство ЧП Луганська обл.	20	7	35,0
2012 р.				
15	Господарство Агр Донецька обл.	25	25	100
16	Господарство БП Харківська обл.	150	118	79,0
17	Господарство Агр Донецька обл.	25	25	100
2013 р.				
18	Господарство Чорн Херсонська обл.	76	30,0	39,5
19	Господарство ЧП Луганська обл.	20	2	10,0
2014 р.				
20	Господарство З Харківська обл.	20	3	15,0
2015 р.				
21	Господарство Слав Донецька обл.	49	14	28,6
22	Господарство Вл Харківська обл.	12	9	75,0
2017 р.				
23	Господарство Ряб Харківська обл.	15	0	0

Аналіз отриманих даних серологічних досліджень свідчить про достатньо активну циркуляцію вірусу інфекційного ларинготрахеїту серед птиці промислових птахівничих господарств у різних областях України в період 2010–2017 років. Так, рівень напруженості імунітету коливався від 4 до 100 %. Високий рівень імунітету (65–100 %) було виявлено у птиці з 5-ти промислових птахівничих господарствах, що становить тільки 35 % від загальної кількості досліджених господарств. У цих 5-ти птахівничих господарствах проводилася специфічна вакцинація проти інфекційного ларинготрахеїту, про що свідчила напруженість імунітету. Відсутність антитіл виявили тільки у птиці з 2х господарств. У той же час як низький рівень напруженості імунітету (5–41,7 %) було виявлено у птахів із 7-ми господарств, що становить 50 % від загальної кількості досліджених. Ці птахівничі господарства не використовували вакцинацію проти ІЛТ в період проведення досліджень і тому наявність антитіл може свідчити про циркуляцію польових вірусів в поголів'ї птиці в цей період, що є важливим з точки зору епізоотології інфекційного ларинготрахеїту. Таким чином, серологічно доведено складну епізоотичну ситуацію щодо інфекційного ларинготрахеїту в Україні в 2010–2017 роках.

Частину результатів, наведених у даному пункті, висвітлено у тезах (Usova et al., 2019).

3.1.2 Серологічний моніторинг інфекційного ларинготрахеїту в промислових господарствах у період 2018–2021 років. Базуючись на результатах аналізу епізоотичної ситуації щодо ІЛТ в 2010–2017 рр. та знаннях, що вона була достатньо складною в той період, ми продовжили в наших дослідженнях серологічний моніторинг ІЛТ в птахівничих господарствах України в 2018–2021 роках, що було наступним етапом наших досліджень. Усього за цей період було обстежено 15 птахогосподарств різних областей України (Донецької, Харківської, Луганської, Черкаської, Хмельницької, Херсонської). Результати цього серологічного моніторингу наведені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 — Результати серологічного моніторингу ІЛТ у курей в птахівничих господарствах, 2018–2021 рр.

Господарство	Вік, діб	К-ть проб	Середній титр	Частка позитивних зразків, %
1	2	3	4	5
2018 рік				
Запорізька область				
Господарство ЗП*	1	10	1377 ± 1502	40,0
	175	12	3312 ± 1667	100
	342	12	2447 ± 1045	91,7
	265	12	3029 ± 2321	83,3
	106	12	2045 ± 1186	83,3
Господарство АП	40	28	401 ± 257	1,1
Господарство БР	400	10	535 ± 240	0
Господарство АПО	-	7	624 ± 540	14,3
Харківська область				
Господарство Бор	300	10	602 ± 850	30,0
	316	10	246 ± 342	10,0
Господарство ШС	-	7	59 ± 36	0
Донецька область				
Господарство САВ	-	7	91 ± 32	0
Господарство ДП	240	7	133 ± 55	0
2019 рік				
Запорізька область				
Господарство ЗП*	393	12	2781 ± 1308	91,7
	308	12	2760 ± 906	100
	148	12	471 ± 449	8,3
	322	10	137 ± 132	0
	457	10	2391 ± 1921	70,0
	181	10	2942 ± 1635	90,0
Господарство Тат	332	10	615 ± 612	20,0
	466	10	88 ± 55	0
	197	12	223 ± 315	8,3
Харківська область				
Господарство Бор	-	7	176 ± 162	0
Господарство ІБ	73	7	17 ± 13	0
Господарство БФ	-	5	546 ± 187	0
Донецька область				
Господарство СТВ	276	7	83 ± 86	0

Продовження таблиці 3.2

1	2	3	4	5
Дніпропетровська область				
Господарство МП	275	10	81 ± 88	0
	270	10	143 ± 75	0
	215	10	134 ± 186	0
2020 рік				
Запорізька область				
Господарство КП*	435	10	2732 ± 1492	80,0
	303	10	4156 ± 1958	100
	180	10	1272 ± 719	60,0
	173	13	816 ± 654	23,1
	475	13	262 ± 320	7,7
	432	13	3671 ± 2360	76,9
	311	13	2596 ± 1465	84,6
	265	13	250 ± 489	15,4
	370	13	2009 ± 2588	61,5
Дніпропетровська область				
Господарство МП	170	10	706 ± 949	20,0
	257	10	1255 ± 1186	40,0
	400	10	230 ± 238	0
	471	10	2659 ± 3036	50,0
	346	10	538 ± 1003	10,0
	238	10	1231 ± 1649	40,0
Господарство Тат	466	14	1529 ± 1997	42,9
	462	14	539 ± 1040	7,1
	356	14	1317 ± 1301	42,9
2021 рік				
Запорізька область				
Господарство КП*	173	13	816 ± 654	23,1
	475	13	262 ± 320	7,7
	432	13	3671 ± 2360	76,9
	318	13	2596 ± 1465	84,6
	265	13	250 ± 489	15,4
	370	13	2009 ± 2588	69,2
	363	10	1067 ± 417	40,0
	327	10	4040 ± 1483	100
Господарство Тат	466	14	1529 ± 1997	46,2
	462	14	539 ± 1040	7,7
	356	14	1317 ± 1301	46,2
	532	10	981 ± 1415	30,0
	332	10	1380 ± 1488	40,0
	330	10	832 ± 1255	20,0

Продовження таблиці 3.2

1	2	3	4	5
Господарство Тат	260	10	475 ± 1208	10,0
	160	10	3234 ± 1764	80,0
	430	10	2077 ± 1462	60,0
Господарство ЗП*	80	10	2060 ± 912	90,0
	-	10	4440 ± 1977	100
	246	10	5577 ± 1742	100
	158	10	4041 ± 1598	100
Харківська область				
Господарство ЯК	-	20	242 ± 292	5,0

Примітка: * — в господарствах проводиться планова вакцинація проти ІЛТ

Як свідчать дані серологічного моніторингу (табл. 3.2), у 2018–2021 роках спостерігалось збереження складної епізоотичної ситуації щодо інфекційного ларинготрахеїту в птахівничих господарствах різних областей України. Необхідно звернути увагу на значну строкатість титрів антитіл у птиці, про що свідчить показник помилки середньої арифметичної. Напружений імунітет було виявлено тільки в двох господарствах Запорізької області (господарство ЗП та господарство КП). У цих двох господарствах вакцинація проти ІЛТ включена до схеми специфічної профілактики. Так, в господарстві ЗП рівень напруженості імунітету до ІЛТ у дорослої птиці коливався від 76,9 % до 100 %. Хоча також були зареєстровані випадки, коли рівень напруженості імунітету у деяких партіях дорослої птиці був суттєво нижчим, ніж необхідний — 8,3–61,5 %. У добового молодняку напруженість імунітету становила 40 %. Що стосується господарства КП, то напруженість специфічного імунітету коливалась від 7,7 до 100 %. Дуже низький рівень специфічного імунітету до ІЛТ було зафіксовано у птиці віком 475 діб. У декількох партіях дорослої птиці також фіксували недостатній рівень захисту проти ІЛТ. У більшості досліджених партій птиці рівень напруженості імунітету відповідав вимогам та становив 76,9–100 %.

У п'яти господарствах (господарство АП, АПО, Бор, МП, ЯК) ми виявили наявність антитіл до вірусу ІЛТ з різним титром та рівнем

позитивних птахів. У той же час статус вакцинації в цих господарствах невідомий. Вісім птахівничих господарств не використовували вакцинацію проти ІЛТ, та у них не було виявлено специфічних антитіл до вірусу.

Таким чином, результати серологічного моніторингу свідчать про можливу циркуляцію вірусу інфекційного ларинготрахеїту серед промислової птиці в Україні. Також встановлено, що ця циркуляція триває, починаючи з 2010 року (період наших спостережень та аналізу).

Результати серологічних досліджень наведено у тезах (Верецун & Музика, 2021).

3.1.3 Аналіз клінічних випадків захворювання курей на ІЛТ та результатів вірусологічних досліджень архівних біологічних зразків з підозрою на ІЛТ в 2010–2017 роках. Ураховуючи результати, які були нами отримані за проведення серологічного моніторингу в 2018–2021 роках, а також аналізу результатів серологічних досліджень проведених в 2010–2017 роках, наступним етапом було проведення вірусологічних досліджень, спрямованих на виділення вірусу та подальше вивчення його властивостей. Також цей етап включав дві складові — аналіз результатів лабораторних досліджень (результати розтину птиці, аналіз архівних фото патологічних та клінічних змін, результати вірусологічних досліджень), які були проведені у відділі вивчення хвороб птиці протягом 2010–2017 років, а також власні лабораторні дослідження (розтин, вірусологічні дослідження), що були проведені в 2018–2021 роках.

Аналіз результатів лабораторних досліджень, які були проведені в відділі вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» в 2010–2017 роках, свідчить, що на території України були зареєстровані спорадичні випадки захворювання птиці на ІЛТ у птахогосподарствах.

У 2010 році за патологоанатомічного розтину курей з клінічними ознаками інфекційного ларинготрахеїту з одного з господарств Харківської області (господарство 1) було виявлено запальні процеси в органах респіраторної системи (геморагічний ларингіт, трахеїт), кров'яні пробки в

трахеї (рис. 3.1). Птиця була вакцинована відповідно до схеми вакцинації від інфекційних захворювань, у тому числі і від ІЛТ.



Рис. 3.1. Кров'яна «пробка» в трахеї у курки з клінічними ознаками ларинготрахеїту з господарства Харківської області (господарство 1).

Під час проведення подальших діагностичних досліджень за дослідження парних сироваток крові на наявність антитіл до вірусу ІЛТ встановлено стабільність середнього титру антитіл (рівень антитіл 4254–4617) при коливаннях середнього відхилення 274–2230 (табл. 3.3) та наявності строкатості титрів антитіл. Оцінюючи ці показники епізоотологічно (стабільність титру за наявності строкатості) можна стверджувати про наявність потенційної циркуляції збудника ІЛТ у поголів'ї птиці.

За вірусологічних досліджень на КЕ було ізольовано вірус, який викликав у курячих ембріонів патологоанатомічні зміни, характерні для вірусу ІЛТ. Аналіз протоколів вірусологічних досліджень дозволив встановити, що під час інфікування КЕ домінували осередкові ураження ХАО саме в місці інокуляції матеріалу (рис. 3.2 та 3.3). Ідентифікація вірусу була проведена в ПЛР. Ізолят вірусу ІЛТ отримав назву **Б 2-10**.

Таблиця 3.3 — Результати серологічних досліджень сироваток крові від курей з клінічними ознаками ІЛТ в птахівничому господарстві Харківської області

№	Вік птиці			
	180 діб		185 діб	
	Рівень антитіл			
	$\log_{10} T$	T	$\log_{10} T$	T
1	3,70	5008	3,37	2344
2	3,66	4593	3,46	2884
3	3,66	4584	3,55	3548
4	3,63	4304	3,42	2630
5	3,66	4574	3,82	6606
6	3,64	4352	3,53	3388
7	3,63	4285	3,55	3548
8	3,66	4613	3,49	3090
9	3,66	4574	3,5	3162
10	3,67	4672	3,62	4168
11	3,67	4711	3,77	5888
12	3,68	4740	3,26	1819
13	3,61	4105	3,96	9120
14	3,67	4721	3,36	2290
15	3,66	4584	3,79	6165
16	3,67	4642	3,94	8709
17	3,73	5352	3,62	4168
18	3,68	4819	3,41	2570
19	3,69	4948	3,89	7762
20	3,67	4642	3,47	2951
21	3,66	4623	3,8	6309
22	3,66	4603	3,26	1949
23	3,62	4143	3,28	1905
24	3,66	4545	3,71	5128
25	3,67	4730		
26	3,72	5250		
Середній титр, $M \pm m$	$3,67 \pm 0,02$	4617 ± 274	$3,58 \pm 0,2$	4254 ± 2230

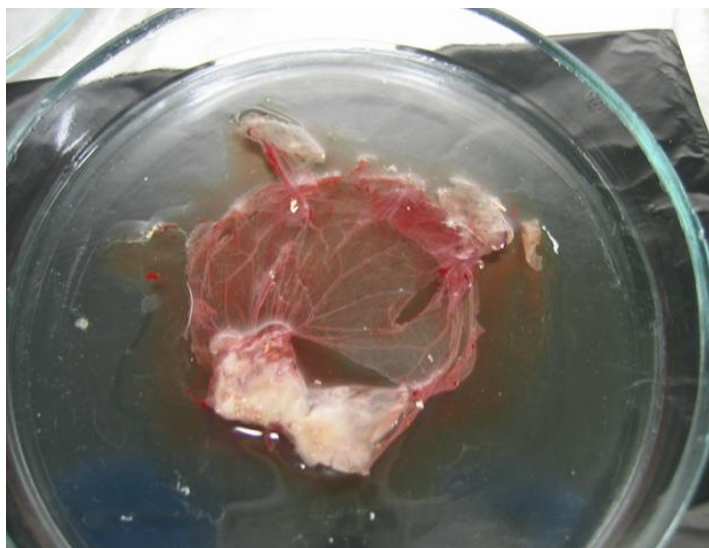
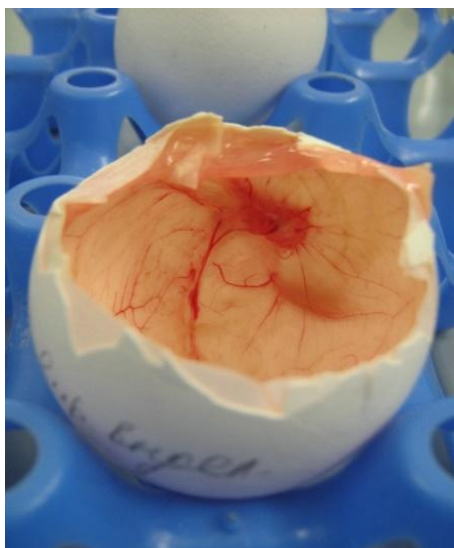


Рис. 3.2–3.3. Осередкові ураження ХАО в місці інокуляції патологічного матеріалу від птиці з господарства 1.

Також у 2010 році в одному з промислових птахівничих господарств Луганської області (Господарство 2) було виявлено захворювання курей з респіраторними ознаками. Кури в цьому господарстві теж були вакциновані проти ІЛТ та інших інфекційних захворювань відповідно до схеми вакцинації, яка була запроваджена у господарстві. Під час клінічного огляду виявлено наступні ознаки: пригнічення, відмова від корму, фотобоязнь, ускладнене дихання з шумом (рис. 3.4), чихання, кашель, кон'юнктивіт, виділення з очей, синусит (рис 3.5).

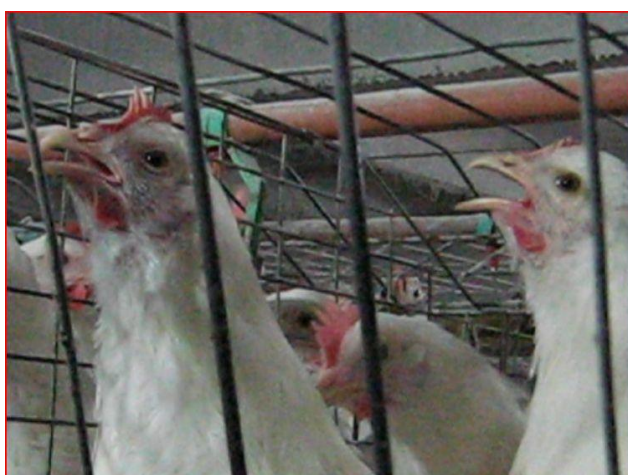


Рис. 3.4. Ускладнене дихання у птиці з підозрою на інфікування з підозрою на інфікування вірусом ІЛТ в господарстві 2.

Рис. 3.5. Виділення з очей у птиці з підозрою на інфікування вірусом ІЛТ в господарстві 2.

За проведення патологоанатомічного розтину у загиблій птиці виявляли: кон'юнктивіт (рис. 3.6), синусит, запалення слизової оболонки верхніх дихальних шляхів, катарально-геморагічний трахеїт (рис. 3.7), у просвіті трахеї виявлялася казеозна пробка, крововиливи в цекальних залозах сліпого кишечника (рис. 3.8).



Рис. 3.6. Кон'юнктивіт у клінічно хворої вимушено забитої птиці з господарства 2.

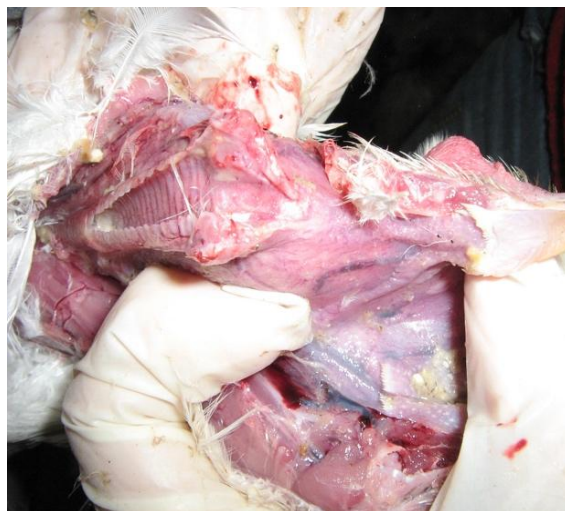


Рис. 3.7. Геморагічне запалення слизової оболонки трахеї та казеозна пробка в просвіті трахеї з господарства 2.



Рис. 3.8. Крапкові крововиливи на цекальних залозах, що характеризують гострий перебіг інфекції у господарстві 2.

За результатами серологічних досліджень у сироватці крові виявлено наявність антитіл до вірусу ІЛТ із значними коливаннями титрів від 8–11649

(у птиці 125-добового віку) та 198–4226 (у птиці 147-добового віку) (табл. 3.4) з урахуванням того, що птиця була вакцинована проти ІЛТ. Таким чином, серологічні дослідження засвідчили потенційну циркуляцію вірусу в стаді.

Таблиця 3.4 — Результати серологічних досліджень сироваток крові від курей з клінічними ознаками ІЛТ в птахівничому господарстві Луганської області у 2010 році

№ з/п	Вік птиці					
	147 діб			125 діб		
	Lg T	T	Результат	Lg T	T	Результат
1	2,59	393	±	1,59	39	-
2	2,45	280	-	1,88	77	-
3	2,82	665	+	0,90	8	-
4	3,12	1325	+	4,07	11649	+
5	2,51	323	-	2,54	349	-
6	2,88	750	+	2,67	467	±
7	2,13	135	-	1,26	18	-
8	2,48	301	-	2,06	114	-
9	3,63	4226	+	3,97	9435	+
10	2,77	582	±	2,35	226	-
11	2,98	962	+	1,88	76	-
12	2,45	280	-	3,32	2101	+
13	2,67	466	±	2,32	210	-
14	2,7	504	±	1,59	39	-
15	2,88	765	+	2,69	499	±
16	2,30	198	-	1,34	22	-
17	2,63	429	±	1,41	26	-
18	2,77	582	±	2,48	303	-
19	2,71	517	±	2,03	108	-
20	2,85	707	+	1,81	65	-
Середній титр, $M \pm m$	$2,7 \pm 0,3$	720 ± 872		$2,2 \pm 0,9$	1292 ± 3217	

За проведення вірусологічних досліджень у інфікованих КЕ реєстрували вузликові ураження ХАО (рис 3.9 та 3.10), які також є характерними змінами для вірусу ІЛТ. Ізольований вірусний ізолят було ідентифіковано в ПЛР, як вірус інфекційного ларинготрахеїту, який отримав назву **ЧП 96-10**.

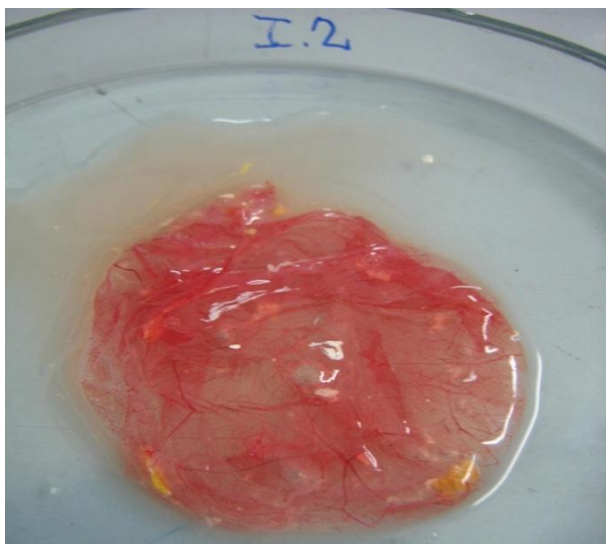


Рис. 3.9. Вузликові ураження на всій поверхні ХАО за інфікування матеріалом з господарства 2.

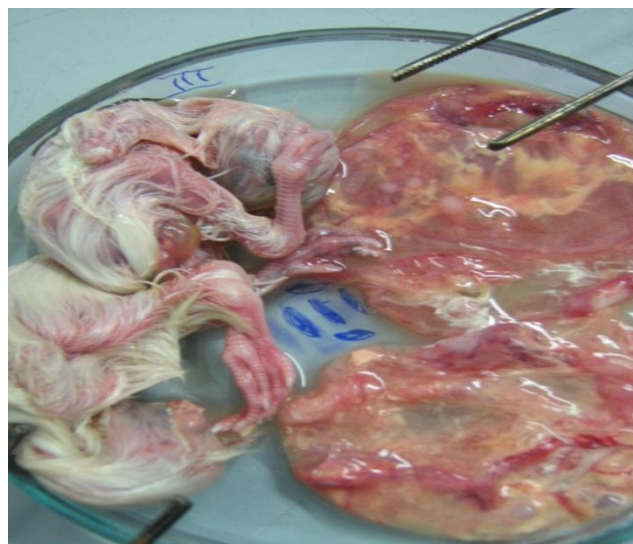


Рис. 3.10. Вузликові ураження на всій поверхні ХАО за інфікування матеріалом з господарства 2.

У 2011 році у відділ вивчення хвороб птиці було доставлено матеріал від загиблих курей 100–120-добового віку з присадибного господарства (господарство 3) з Харківської області. Із даних анамнезу було встановлено, що вакцинація проти інфекційних захворювань, у тому числі і проти ІЛТ, не проводилася. За проведення розтину встановлено: риніт, кон'юнктивіт, гіперемія слизової оболонки трахеї, печінка нерівномірно забарвлена та щільної консистенції, крапкові крововиливи на серці, пневмонія, селезінка збільшена, холецистит, збільшення нирок, катарально-геморагічне запалення слизової оболонки тонкого відділу кишечника, цекальні залози гіперемійовані, смугасті крововиливи на слизовій оболонці прямої кишки.

Під час проведення вірусологічних досліджень встановлено загибель інфікованих ембріонів. При їх розтині виявлено чисельні осередки ураження ХАО, набряк ХАО, відставання КЕ в розвитку, що також є характерним для вірусу ІЛТ (рис. 3.11–3.12). Ізольований вірус було ідентифіковано в ПЛР як вірус інфекційного ларинготрахеїту. Цей вірус отримав назву **В 59-11**.

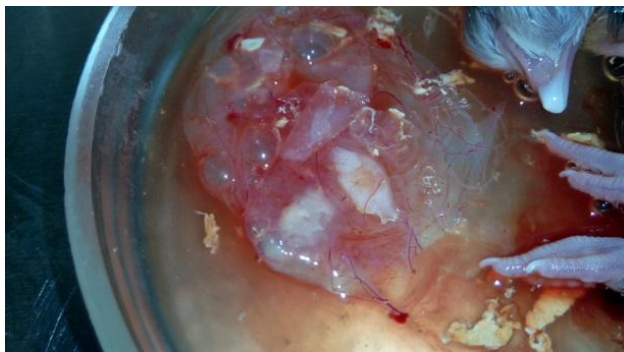


Рис. 3.11. Набряк ХАО у КЕ інфікованих матеріалом від курей з господарства 3 (інфікування нативним матеріалом).



Рис. 3.12. Набряк ХАО та відставання у розвитку КЕ інфікованих матеріалом від курей з господарства 3 (інфікування матеріалом у розведенні 10^{-1}).

У 2012 році в одному з промислових птахівничих господарств (господарство 6) Донецької області у курей-несучок кросу Декалб білий 138-добового віку було виявлено збільшення загигелі птиці у 10 разів за відсутності чітких клінічних ознак захворювання. Птиця була вакцинована за стандартною схемою для кросу, у тому числі і проти ІЛТ.

За розтину загиглої птиці виявляли гіперемію слизової оболонки нижньої повіки, трахеїт, кров'яні тяжі в просвіті трахеї, пневмонію, аеросакулїт. Внаслідок гострого інфекційного процесу патологоанатомічні зміни було виявлено не тільки у органах респіраторної системи, але й у інших органах, зокрема: у серці (перикардит, гідроперикардит, крапчасті крововиливи), печінці (дрябла консистенція, кровонаповнена), селезінці та нирках (збільшені), кишечнику (катарально-геморагічний ентерит).

Під час проведення серологічних досліджень у птиці виявлено високий рівень антитіл (середній титр 1009 ± 470) до вірусу інфекційного ларинготрахеїту (таблиця 3.5) та коливання титрів від 1:542 до 1:2199. В той же час щодо інших інфекційних захворювань ситуація була стабільною, антитіла до вірусу грипу були відсутні, рівень антитіл до вірусу НХ та ІБК в межах норми. Такі дані серологічного моніторингу вказували на можливість циркуляції вірусу інфекційного ларинготрахеїту у даному стаді птиці.

Таблиця 3.5 — Результати серологічних досліджень сироваток крові від курей з клінічними ознаками ІЛТ в птахівничому господарстві Донецької області в 2012 році

№ з/п	ІЛТ		
	Lg T	T	результат
1	3,34	2171	+
2	3,15	1402	+
3	3,23	1706	+
4	2,86	731	+
5	3,15	1413	+
6	2,85	702	+
7	3,34	2199	+
8	3,09	1237	+
9	3,21	1614	+
10	3,13	1364	+
11	2,81	652	+
12	2,97	927	+
13	3,09	1220	+
14	2,73	542	+
15	3,13	1357	+
16	2,96	915	+
17	2,74	547	+
18	3,27	1865	+
19	3,10	1257	+
20	3,00	996	+
21	2,98	964	+
22	3,09	1241	+
23	2,77	595	+
24	3,00	1008	+
25	3,16	1455	+
M ± m	3,05 ± 0,178	1009 ± 470	100% CV=39,1%

За результатами вірусологічних досліджень ізольовано вірусний агент, який викликав патологоанатомічні зміни на хоріон-алантоїсній оболонці КЕ (вузликові ураження з непрозорою білою периферією, набряк, крапчасті крововиливи, потовщення), які характерні для вірусу інфекційного ларинготрахеїту. За результатами постановки ПЛР

встановлено, що патологічний матеріал містив геном вірусу інфекційного ларинготрахеїту. Ізольований вірус отримав назву **A 04-12**.

Також у 2012 році захворювання з респіраторними ознаками було виявлено в Харківській області серед курей кросу Хай Лайн білий (господарство 4). При розтині птиці виявили наступні патологоанатомічні зміни: крововиливи на слизовій оболонці нижнього віку, слиз у ротовій порожнині, трахеїт, м'язи ціанотичні, печінка дрябла, збільшена, вишневого кольору, перикардит, пневмонія, фібринозно-казеозна «пробка» в трахеї, повітряності мішки з відкладенням фібрину, селезінка збільшена, кутикуліт, нирки збільшені, катаральний ентерит. За результатами ПЛР в патологічному матеріалі виявлено геном збудника ІЛТ. При проведенні вірусологічних досліджень ізолят отримав назву **X 2-12**.

У 2011–2012 роках захворювання на ІЛТ було виявлено в птахівничому господарстві АР Крим, збудник (ізолят КДС) було ізольовано та вивчено Воротиловою Н. Г. (Воротилова, 2014)

Аналізуючи архівні результати лабораторних досліджень, які були проведені у відділі вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ», ми встановили, що у період з 2010 по 2017 роки в Україні серед курей промислових та присадибних господарств активно циркулював збудник інфекційного ларинготрахеїту, не дивлячись на вакцинацію поголів'я проти цього захворювання. Про це свідчили результати серологічних досліджень (строкатість титрів на фоні вакцинації, наявність антитіл у птиці за відсутності вакцинації тощо). Підтвердженням циркуляції також було виділення вірусів з патологічного матеріалу та ідентифікації його в ПЛР. Крім того, аналізуючи наявні протоколи розтину та архівні фото клінічної картини, патологічних змін, можна стверджувати, що в той період захворювання на ІЛТ перебігало типово, із характерними клінічними ознаками та патологоанатомічною картиною.

Результати досліджень описані у науковій статті (Верецун et al., 2021).

Для подальших досліджень ми провели пасажування польових ізолятів вірусу ІЛТ, виділених в 2011–2012 роках для відновлення їх біологічних властивостей після зберігання.

3.1.4 Вірусологічні дослідження та виділення вірусу інфекційного ларинготрахеїту від хворих курей в 2019 році. У 2019 році у відділ вивчення хвороб птиці було доставлено хворих курей 134-добового віку кросу Ломан Білий з фермерського господарства (господарство 7) з Сумської області з підозрою на інфікування вірусом інфекційного ларинготрахеїту птиці.

Під час клінічного огляду встановлено наявність утрудненого дихання, слюзотеча. Також в господарстві спостерігали підвищену загибель птиці.

За розтину вимушено забитих та загиблих курей реєстрували кон'юнктивіт, гіперемію слизової оболонки трахеї, просвіт трахеї заповнений густою масою, двостороння пневмонія, збільшення селезінки, кровонаповнення печінки та збільшення її у розмірах. У деяких загиблих курей в трахеї виявлено кров'яні згустки, які повністю перекривали просвіт (рис. 3.13–3.16).



Рис. 3.13. Кон'юнктивіт у клінічно хворих вимушено забитих курей з господарства 7.



Рис. 3.14. Геморагічний трахеїт та згусток крові у просвіті трахеї з господарства 7.



Рис. 3.15. Геморагічний трахеїт у клінічно хворих вимушено забитих курей з господарства 7.



Рис. 3.16. Збільшення селезінки у загиблих курей з господарства 7.

З метою встановлення причин захворювання та загибелі птиці були проведені вірусологічні дослідження. В якості патологічного матеріалу було використано селезінку, трахею, легені. Було проведено два послідовних пасажі. Результати наведені в таблиці (табл. 3.6).

Як свідчать дані таблиці 3.6, при проведенні вірусологічних досліджень протягом 2 пасажів було ізольовано інфекційний агент, який викликав вузликові ураження ХАО з непрозорою білою периферією, набряк та потовщення ХАО, крапчасті крововиливи (рис. 3.17, 3.18) за відсутності контамінації бактеріальною мікрофлорою. Необхідно зазначити, що інфекційний агент було ізольовано з селезінки. Ідентифікацію було проведено в ПЛР. За даними ПЛР встановлено, що ізольований вірус належить до вірусу інфекційного ларинготрахеїту. Він отримав назву Суми/6-11/19.

Таблиця 3.6 — Вірусологічні дослідження патологічного матеріалу від хворих курей (господарство 7) з підозрою на інфекційний ларинготрахеїт

Патмате-ріал	Кількість інфікова-них КЕ	Термін спостереження (год) та кількість КЕ, що загинули							
		24	48	72	96	120	144	168	Наявність змін на ХАО
І пасаж									
Трахея 1	3	-	-	-	-	-	-	-	відсутні
Трахея 2	3	-	-	-	-	2	-	-	відсутні
Легені	2	-	-	-	-	-	-	-	відсутні
Селезінка	3	-	-	-	-	-	-	-	+ + — —
ІІ пасаж									
Трахея 1	4	-	-	-	-	-	-	-	відсутні
Трахея 2	4	-	-	-	-	-	-	-	відсутні
Легені	4	-	-	-	-	-	-	-	відсутні
Селезінка	4	-	-	-	-	2	-	-	+ + + +

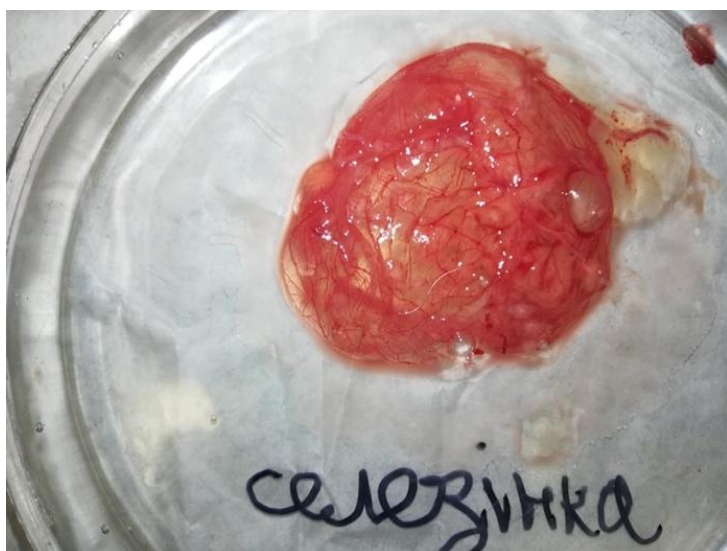


Рис. 3.17. Набряк та крапчасті крововиливи на хоріон-алантоїсній оболонці КЕ, інфікованих матеріалом від птиці з господарства 7 (5 діб інкубації).



Рис. 3.18. Вузликіві ураження на хоріон-алантоїсній оболонці КЕ інфікованих матеріалом від птиці з господарства 7 (через 5 діб інкубації).

Таким чином, комплексно аналізуючи результати епізоотологічного моніторингу у 2010–2021 роках, в Україні зафіксована активна циркуляція вірусу інфекційного ларинготрахеїту серед курей як промислових, так і присадибних птахівничих господарств. За результатами вірусологічних досліджень у ННЦ «ІЕКВМ» із патологічного матеріалу від хворих птахів з патологоанатомічними змінами ІЛТ, який зібрано в період з 2010 по 2019 рр. у різних регіонах України, ізолювано 7 ізолятів вірусів ІЛТ (таблиця 3.7).

Із 7 ізолятів більшість — 5 вірусних ізолятів (Б 2-10, ЧП 96-10, Х 2-12, КДС, А 04-12) було ізолювано від птиці, яку утримували у промислових птахівничих господарствах і тільки два віруси (В 59-11 та Суми/6-11/19) — від птиці, яка утримувалася у присадибних господарствах. Також п'ять вірусів (Б 2-10, ЧП 96-10, Х 2-12, КДС, Суми 6-11/19) було ізолювано від птиці, яка вакцинувалася проти інфекційного ларинготрахеїту відповідно до схеми вакцинації. У той же час тільки два віруси (В 59-11 та А 04-12) було виділено від хворих курей, які не вакцинувалися проти інфекційного ларинготрахеїту.

Отримані результати щодо циркуляції вірусу ІЛТ в Україні викладені у наукових статтях (Верецун et al., 2021; Музика et al., 2018).

3.2 Вивчення біологічних властивостей польових ізолятів вірусу інфекційного ларинготрахеїту, які циркулюють в Україні

Наступним етапом наших досліджень було вивчення деяких біологічних властивостей ізолятів вірусу інфекційного ларинготрахеїту, які були ізолювані від курей в Україні у період 2010–2021 років.

Здатність викликати аглютинацію еритроцитів. Ураховуючи той факт, що є повідомлення, що деякі віруси ІЛТ володіють гемаглютинуючими властивостями, ми дослідили здатність українських ізолятів викликати гемаглютинацію еритроцитів півня.

Таблиця 3.7 — Узагальнені дані щодо вірусологічних досліджень та виділених ізолятів вірусу ІЛТ від курей з промислових птахівничих господарств України в 2010–2019 роках

№	Регіон	Рік	Вік птиці, напрямок продуктивності	Тип господарства	Інформація про наявність вакцинації	Клінічні прояви	Патологоанатомічна картина	Діагностичні дослідження	Назва ізоляту
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Господарство 1 Харківська обл.	2010	180 діб, несучка	Невелике промислове	Вакцинована	Пригнічення, відмова від корму, кашель.	Трахеїт, кон'юнктивіт, синусит, катаральний риніт	Ізольовано вірус	Б 2-10
2	Господарство 2 Луганська обл.	2010	125–433 діб несучки	Невелике промислове	Вакцинована	Пригнічення, відмова від корму, затруднене дихання з шумом, чхання, кашель, кон'юнктивіт, синусит, серозні виділення з очей.	Геморагічний трахеїт, кон'юнктивіт з крововиливами, геморагічний ентерит, перикардит, гепатит, холецистит, геморагічний ентерит, клоацит, сальпінгіт, крововиливи на кон'юнктиві, геморагічний трахеїт.	Ізольовано вірус	ЧП 96-10
3	Господарство 3 Харківська обл.	2011	120 діб, м'ясо-яєчні	Присадибне	Не вакцинована	Пригнічення, відмова від корму, кашель.	Трахеїт, кон'юнктивіт, синусит, катаральний риніт.	Ізольовано вірус	В 59-11
4	Господарство 4 Харківська обл.	2012	189–193 діб, несучка, крос Хай Лайн білий	Невелике промислове	Вакцинована	Пригнічення, відмова від корму, кашель.	Слиз у ротовій порожнині, трахеїт, фібринозно-казеозна пробка в нижній частині трахеї, печінка збільшена, в'яла, повітроносні мішки з відкладеннями фібрину, селезінка з осередками некрозу, збільшена, фундальні залози набряклі, дуоденіт з осередками некрозу, нирки збільшені, бугристі, смугасті крововиливи на слизовій прямої кишки, катаральний ентерит.	Ізольовано вірус	Х 2-12

Продовження таблиці 3.7

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	Господарство 5, АР Крим	2012	150–162 доби, несучка	Невелике промислове	Вакцинована	Клінічні ознаки хвороби від слабо виражених (зниження вживання корму, малорухливість, пригнічення) до яскраво виражених респіраторних ознак (важке дихання, чхання, хрипи).	Катарально-геморагічний ларинготрахеїт, слизові оболонки з численними крововиливами, просвіт трахеї заповнений катарально- геморагічним ексудатом. У деяких особин в просвіті гортані та трахеї фібринозні пробки.	Ізольовано вірус	КДС
6	Господарство 6 Донецька обл.	2012	138 діб, несучка, крос Декалб білий	Невелике промислове	Не вакцинована	Раптове збільшення загибелі птиці без значних видимих клінічних ознак.	Гіперемія слизової оболонки нижньої повіки, трахеїти, кров'яні тяжі в просвіті трахеї, пневмонія, аеросакуліти, перикардити, крапчасті крововиливи на серці, селезінка та нирки збільшені, катарально-геморагічний ентерит.	Ізольовано вірус	А 04-12
7	Господарство 7 Сумська обл.	2019	130 доб, несучка	Присадибне	вакцинована	Ознаки респіраторного захворювання, загальне пригнічення. Збільшення відсотку загибелі птиці.	Трахеїт, кон'юнктивіт, синусит, катаральний риніт.	Ізольовано вірус	Суми/6- 11/19

У дослідженнях використовували віруси ізолювані в період 2010–2019 років з Харківської, Сумської, Луганської та Донецької областях. Результати представлені в таблиці 3.8.

Таблиця 3.8 — Результати реакції гемаглютинації з ізолятами вірусу ІЛТ

№	Назва ізоляту	РГА
1	Б 2-10	негативна
2	ЧП 96-10	негативна
3	В 59-11	негативна
4	Х 2-12	негативна
5	КДС	негативна
6	А 04-12	негативна
7	Суми/6-11/19	негативна

Під час перевірки гемаглютинаційних властивостей українські ізоляти вірусу ІЛТ не викликали аглютинацію еритроцитів півня, що свідчить про відсутність гемаглютинаційних властивостей у цих вірусів.

Здатність культивуватися в КЕ. Також нами були вивчена здатність вірусів ІЛТ до подальшого культивування в курячих ембріонах та встановлено інфекційний та летальний титр вірусу ІЛТ. Ураховуючи той факт, що усі ізоляти були ізолювані в КЕ, то вони здатні до культивування в КЕ. У той же час, необхідно було встановити титр інфекційної та летальної активності ізолятів, що нам дасть можливість порівняти ступінь репродукції різних ізолятів в КЕ. Для реалізації цього завдання було проведено титрування польових ізолятів: Б 2-10, ЧП 96-10, В 59-11, А 04-12 та Суми/6-11/19. Результати титрування вірусів наведені в таблицях 3.9–3.13.

Таблиця 3.9 — Результати титрування на КЕ ізоляту Б 2-10 вірусу ІЛТ

Розведення	Кількість інфікованих КЕ	Термін спостереження та кількість КЕ, що загинули					
		24 години	48 годин	72 години	96 годин	120 годин	Наявність змін на ХАО
10^{-1}	4	-	4				++++
10^{-2}	4	-	-	2	-	-	++++
10^{-3}	4	-	-	4			++++
10^{-4}	4	-	-	2	-	-	++++
10^{-5}	4	-	-	-	1	-	++++
10^{-6}	4	-	-	-	-	-	відсутні
10^{-7}	4	-	-	-	1	-	відсутні

Таблиця 3.10 — Результати титрування на КЕ ізоляту ЧП 96-10 вірусу ІЛТ

Розведення	Кількість інфікованих КЕ	Термін спостереження та кількість КЕ, що загинули					
		24 години	48 годин	72 години	96 годин	120 годин	Наявність змін на ХАО
10^{-1}	4	1	3				++++
10^{-2}	4	-	1	1	1	-	++++
10^{-3}	4	-	-	3	1		++++
10^{-4}	4	-	-	2	-	-	+++-
10^{-5}	4	-	-	-	-	1	+++-
10^{-6}	4	-	-	-	-	-	відсутні
10^{-7}	4	-	-	-	-	-	відсутні

Таблиця 3.11 — Результати титрування на КЕ ізоляту В 59-11 вірусу ІЛТ

Розведення	Кількість інфікованих КЕ	Термін спостереження та кількість КЕ, що загинули					
		24 години	48 годин	72 години	96 годин	120 годин	Наявність змін на ХАО
10^{-1}	4	-	4				++++
10^{-2}	4	-	-	2	1	1	++++
10^{-3}	4	-	1	2	1		++++
10^{-4}	4	-	-	2	1	1	++++
10^{-5}	4	-	-	-	1	-	++++
10^{-6}	4	-	-	-	2	-	++--
10^{-7}	4	-	-	-	1	-	+---

Таблиця 3.12 — Результати титрування на КЕ ізоляту А 04-12 вірусу ІЛТ

Розведення	Кількість інфікованих КЕ	Термін спостереження та кількість КЕ, що загинули					
		24 години	48 годин	72 години	96 годин	120 годин	Наявність змін на ХАО
10^{-1}	4	-	2	-	-	-	++++
10^{-2}	4	-	-	2	-	-	++++
10^{-3}	4	-	-	2			++++
10^{-4}	4	-	-	2	-	-	++--
10^{-5}	4	-	-	-	-	-	+++-
10^{-6}	4	-	-	-	-	-	відсутні
10^{-7}	4	-	-	-	-	-	відсутні

Таблиця 3.13 — Результати титрування на КЕ ізоляту Суми/6-11/19 вірусу ІЛТ

Розведення	Кількість інфікованих КЕ	Термін спостереження та кількість КЕ, що загинули					
		24 години	48 годин	72 години	96 годин	120 годин	Наявність змін на ХАО
10^{-1}	4	-	-	-	-	-	++++
10^{-2}	4	-	-	2	1	-	++++
10^{-3}	4	-	-	2	1		++++
10^{-4}	4	-	-	2	1	-	++++
10^{-5}	4	-	-	-	-	2	+++-
10^{-6}	4	-	-	-	-	-	відсутні
10^{-7}	4	-	-	-	-	-	відсутні

Виходячи з отриманих даних, ми розраховували інфекційний та летальний титри ізолятів вірусу ІЛТ, які були ізольовані в різних регіонах України та в різних господарствах у різні роки. Результати наведено в таблиці 3.14. Установлено, що найбільш активним у репродукції в КЕ, при цьому з найбільшим інфекційним титром, був ізолят В 59-11, виділений від невакцинованої птиці з присадибного птахівничого господарства у 2011 році. Він також мав і найбільший летальний титр для КЕ, що свідчить про його патогенність до КЕ. Що стосується інших ізолятів, то їх інфекційний титр був приблизно однаковим $5,0\text{--}5,5 \lg \text{ЕІД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$, летальний титр коливався в межах $3,46\text{--}4,0 \lg \text{ЕЛД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$ за виключенням ізоляту А 04-12, летальний титр якого був $2,5 \lg \text{ЕЛД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$.

Таблиця 3.14 — Результати визначення інфекційного та летального титру польових ізолятів вірусу ІЛТ, ізольованих в 2010–2019 роках в Україні.

Назва ізоляту	Рік	Інфекційний титр, lg ЕІД50/0,1 см ³	Летальний титр, lg ЕЛД50/0,1 см ³
Б 2-10	2010	5,5	4,0
ЧП 96-10	2010	5,16	4,0
В 59-11	2011	6,23	5,36
А 04-12	2012	5,0	2,5
Суми/6-11/19	2019	5,33	3,46

Патогенність для птиці. Також ми вивчили здатність викликати захворювання та загибель у чутливих курчат трьох українських ізолятів, які за інфекційною активністю для КЕ були приблизно однаковими. Курчат інфікували інтратрахеально. Для біопроби використано ізоляти вірусу ІЛТ Б 2-10, ЧП 96-10 та А 04-12. Доза інфікування ізолятами Б 2-10, ЧП 96-10 становила 5,0 lg ЕІД50/0,1 см³. В дослідках з ізолятом А 04-12 використовували 10 %-ву суспензію патматеріалу від загиблої птиці (група 1) та екстраембріональну рідину інфікованих курячих ембріонів (група 2) в дозі 5,0 lg ЕІД50/0,1 см³. Після інфікування за птицею спостерігали протягом 15 діб.

Результати обліку патогенності наведені в таблицях 3.15–3.17.

Таблиця 3.15 — Динаміка захворювання та загибелі птиці, експериментально інфікованої ізолятом ЧП 96-10 вірусу ІЛТ

Клінічний стан птиці	Доба після зараження														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Інфіковані всього	15														
Здорова	15	15	15	15	15	15	15	15	15	–	–	–	–	–	–
Хвора	–	–	–	–	–	–	–	–	–	15	15	9	6	6	3
Загибла	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	6	3	–	3

Таблиця 3.16 — Динаміка захворювання та загибелі птиці, експериментально інфікованої ізолятом Б 2-10 вірусу ІЛТ

Клінічний стан птиці	Доба після зараження														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Здорова	15	15	15	15	15	15	15	15	15	—	—	—	—	—	—
Хвора	—	—	—	—	—	—	—	—	—	15	15	15	9	3	—
Загибла	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6	6	3

Таблиця 3.17 — Динаміка захворювання та загибелі птиці, експериментально інфікованої ізолятом А 04-12 вірусу ІЛТ

Клінічний стан птиці		Доба після зараження														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Група 1	Здорова	2	2	2	2	2	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—
	Хвора	—	—	—	—	—	—	—	2	2	2	2	2	2	2	2
	Загибла	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Група 2	Здорова	2	2	2	2	2	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—
	Хвора	—	—	—	—	—	—	—	2	2	2	2	2	2	2	2
	Загибла	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

За результатами проведених експериментальних досліджень встановлено, що ознаки захворювання (загальне пригнічення, діарея, респіраторні шуми, утруднене дихання) спостерігали в усіх експериментах, починаючи з 8–10 доби. Захворюваність становила 100 % експериментально інфікованого поголів'я. За інфікування ізолятами Б 2-10, ЧП 96-10 специфічну загибель птиці спостерігали починаючи з 12–13 доби. У цих експериментах загибель становила 40 %. Наприкінці дослідів (15 доба) загинуло 80 % птиці, інфікованої ізолятом ЧП 96-10. Під час розтину загинувих курчат реєстрували характерні для ІЛТ патологоанатомічні зміни. За експериментального дослідження ізоляту А 04-12 було встановлено, що ознаки захворювання (загальне пригнічення, діарея, респіраторні шуми, утруднене дихання) виявляли у курей обох груп птиці з 8 доби досліду. Загибель курчат була відсутня упродовж всього терміну спостережень. На 15 добу було проведено вимушений забій піддослідної птиці. Під час розтину виявляли патологічні зміни, характерні для вірусу ІЛТ (катаральний

трахеїт, гіперплазія та гіперемія селезінки). Було проведене гістологічне дослідження зразків патматеріалу від вимушено забитої птиці. Аналізуючи результати визначення патогенності встановлено, що ізолят Б 2-10 виявився більш вірулентним і спричинив загибель 100 % поголів'я піддослідної птиці.

Гістологічні зміни. Після проведення експериментального інфікування нами були проведені дослідження мікроскопічних змін в тканинах курчат, інфікованих ізолятом А 04-12 вірусу ІЛТ. У результаті гістологічного дослідження трахеї встановлено потовщення власної пластинки слизової оболонки за рахунок інфільтрації малими і середніми лімфоцитами, макрофагами, псевдоеозинофілами (рис. 3.19). Спостерігали епітеліальні клітини трахеї з ознаками мукоїдного набухання (рис. 3.20). Підслизова основа була з ознаками набряку.

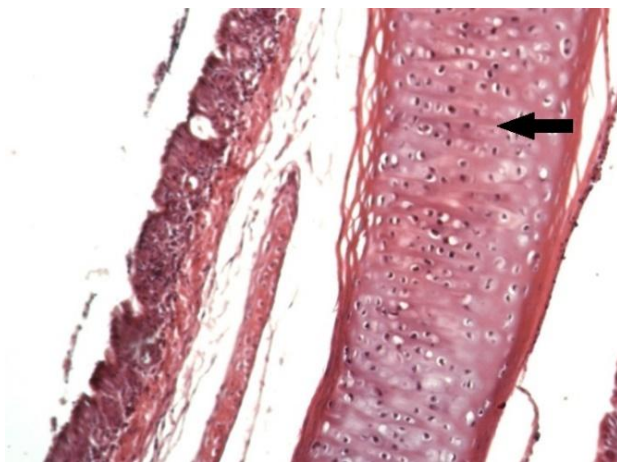


Рис. 3.19. Трахея курчати, інфікованого вірусом ІЛТ (група 1). Власна пластинка слизової оболонки інфільтрована лімфоїдно-гістіоцитарними клітинами. $\times 100$, Г+Е.

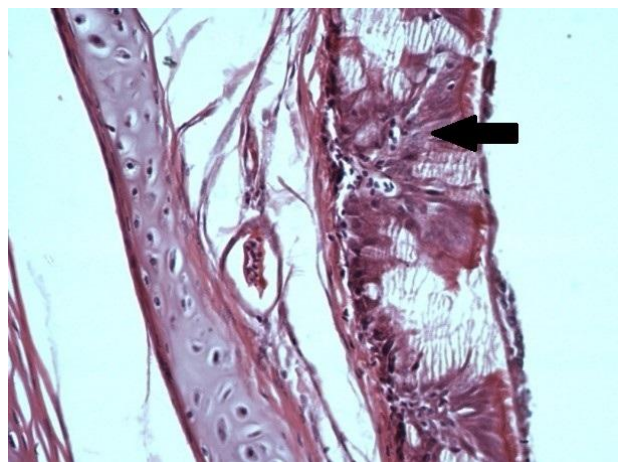


Рис. 3.20. Трахея курчати, інфікованого вірусом ІЛТ (група 1). Епітеліальні клітини з ознаками мукоїдного набухання. $\times 200$, Г+Е.

Кількість келихоподібних клітин зменшена. На окремих ділянках слизової оболонки спостерігається десквамація епітеліальних клітин з оголенням підслизової основи (рис. 3.21). У просвіті незначна кількість ексудату.

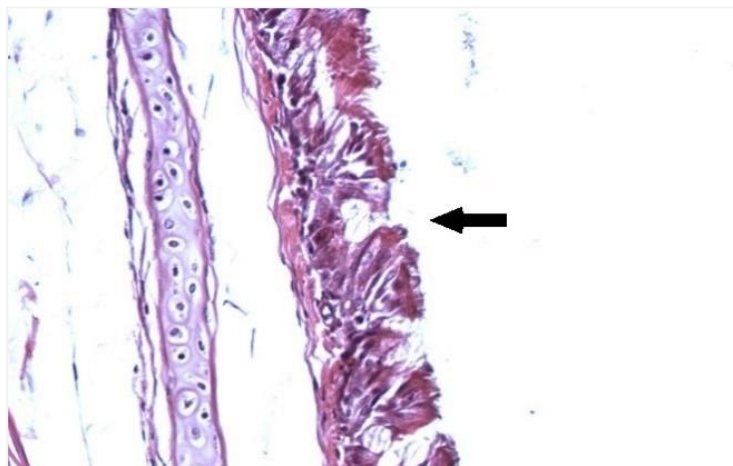


Рис. 3.21 — Трахея курчати інфікованого вірусом ІЛТ (група 1). Десквамація епітеліальних клітин. $\times 100$, Г+Е

У курчат групи 2 зміни менш виражені, але власне слизова також інфільтрована лімфоїдними клітинами (рис. 3.22), залози мають більшу кількість келихоподібних клітин, капіляри розширені. Епітеліальні клітини з ознаками мукоїдного набухання, у просвіті міститься незначна кількість екссудату (рис. 3.23).

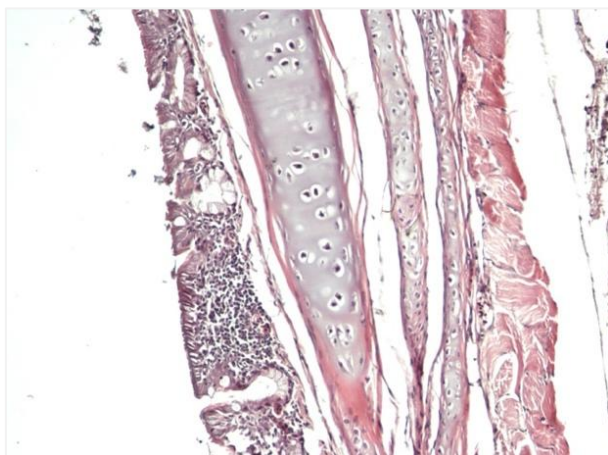


Рис. 3.22. Трахея курчати інфікованого вірусом ІЛТ (група 2). Інфільтрація СО лімфоїдними клітинами $\times 100$, Г+Е.

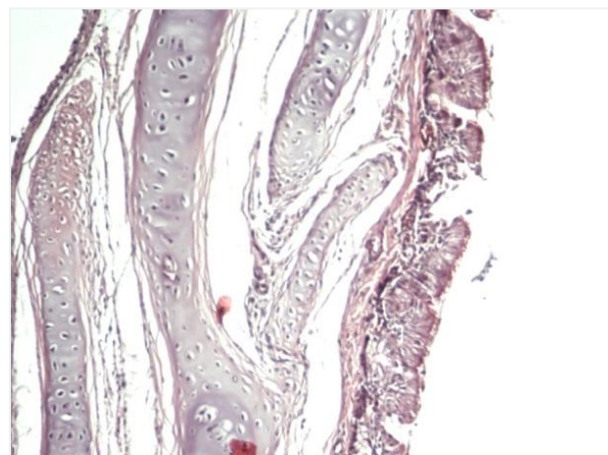


Рис. 3.23. Трахея курчати інфікованого вірусом ІЛТ (група 2). Десквамація епітеліальних клітин, мукоїдне набухання. $\times 100$, Г+Е.

Під час дослідження легень курчат групи 1 встановлено потовщення стінки бронхіол (рис. 3.24). Навколо них скупчення лімфоїдних клітин (рис. 3.25).

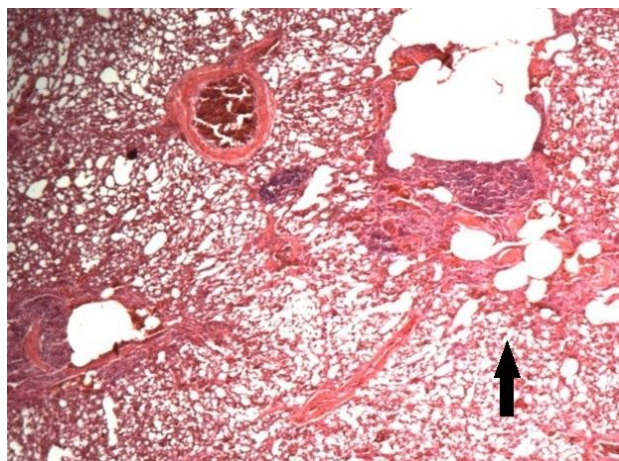


Рис. 3.24. Легені курчати, інфікованого вірусом ІЛТ (група 1). Потовщення стінки бронхіол. $\times 100$, Г+Е.

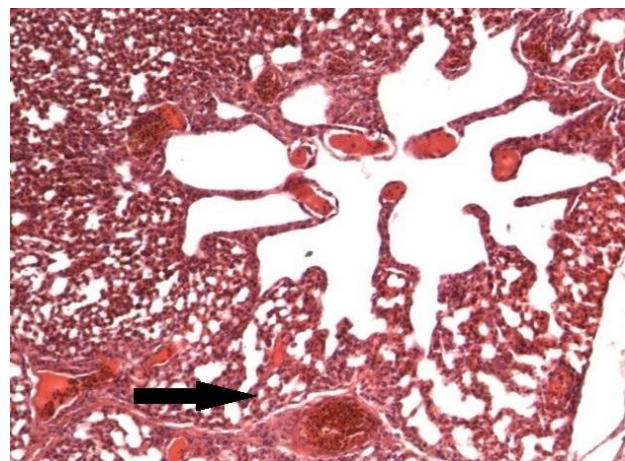


Рис. 3.25. Легені курчати, інфікованого вірусом ІЛТ (група 1). Скупчення лімфоїдних клітин. $\times 100$, Г+Е.

Капіляри розширені, переповнені форменими елементами крові. Власне слизова оболонка інфільтрована лімфоїдними клітинами. У курчат групи 2 гістоморфологічні зміни легень менш виражені. Спостерігається інфільтрація лімфоїдними клітинами, псевдоеозинофілами, макрофагами навколо кровоносних судин та у власній пластинці окремих бронхіол.

У результаті гістоморфологічного дослідження селезінки не виявлено значних відхилень від норми. При гістологічному дослідженні селезінки курчат групи 1 та 2 встановлено, що капсула органа без змін. Орган кровонаповнений, біла пульпа займає значну частину площі зрізу (рис. 3.26).

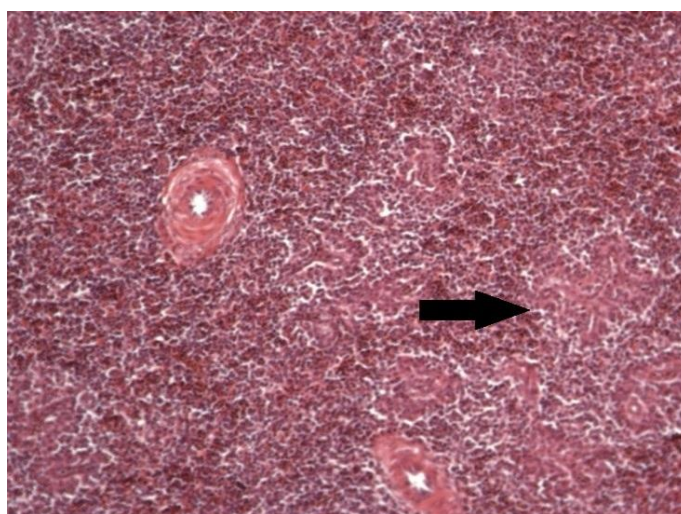


Рис. 3.26. Селезінка курчати інфікованого вірусом ІЛТ (група 1). Біла пульпа займає значну частину площі зрізу. $\times 50$, Г+Е

Гермінативні фолікули одиничні, периартеріальні лімфоїдні муфти широкі (рис. 3.27). Збільшена кількість псевдоеозинофілів. Ретикулоендотеліальні муфти не збільшені в розмірі.

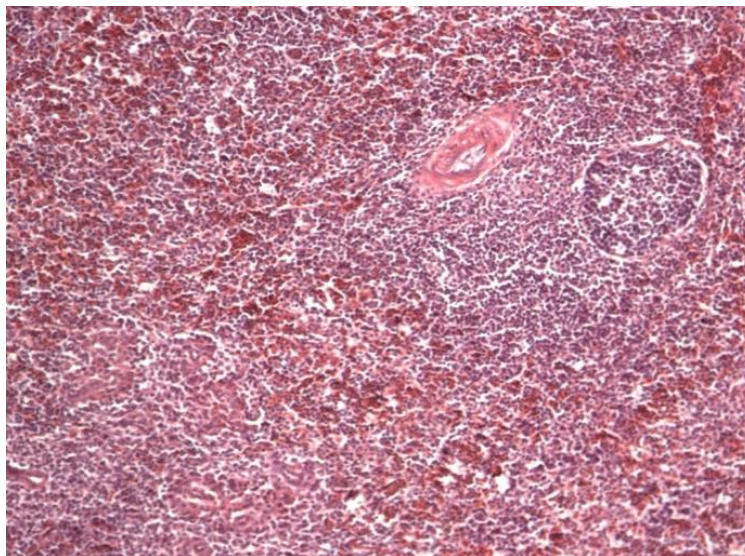


Рис. 3.27. Селезінка курчати інфікованого вірусом ІЛТ (група 2). Гермінативні фолікули одиничні, периартеріальні лімфоїдні муфти широкі. $\times 50$, Г+Е.

За гістологічного дослідження товстого кишечника та цекальної тонзили встановлено, що власна пластинка слизової оболонки містить лімфоїдну тканину з численими лімфоїдними фолікулами та дифузну лімфоїдну тканину, представлену малими та середніми лімфоцитами, макрофагами, плазматичними клітинами, псевдоеозинофілами. М'язова пластинка слизової оболонки представлена гладком'язовими клітинами. Слизова оболонка вистелена одношаровим призматичним епітелієм, що містить багато келихоподібних клітин. М'язова оболонка складається із двох шарів. У курчат групи 2 цекальна тонзила містить невелику кількість лімфоїдних вузликів, які не щільно виповнені лімфоїдними клітинами (рис. 3.28). Спостерігаються ознаки катарального запалення. Епітеліальний шар потовщений, частина клітин десквамовані (рис. 3.29). У курчат групи 1 спостерігаються крововиливи, що розташовуються переважно на верхівках ворсинок. Ворсинки потовщені, деформовані. На окремих ділянках спостерігається десквамація клітин, а на інших потовщення епітеліального шару.

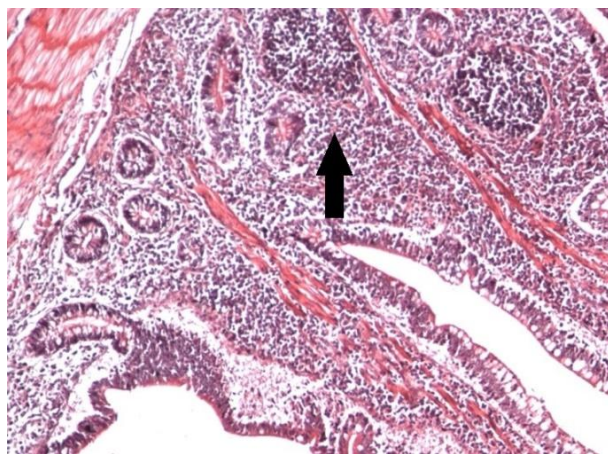


Рис. 3.28. Сліпа кишка курчати інфікованого вірусом ІЛТ (група 2). Лімфоїдні вузлики нечислені, нещільно виповнені лімфоїдними клітинами. $\times 100$, Г+Е.

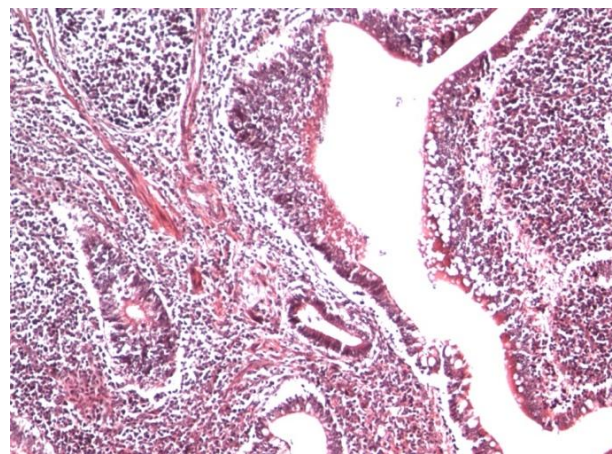


Рис. 3.29. Сліпа кишка курчати інфікованого вірусом ІЛТ (група 2). Катаральне запалення. $\times 100$, Г+Е.

Результати вищенаведених досліджень висвітлені у публікації Veretsun et al. (2021).

3.3 Вивчення молекулярно-генетичних властивостей польових ізолятів вірусу ІЛТ

Молекулярно-генетичні дослідження українських ізолятів вірусу ІЛТ, виділених у різні роки в різних регіонах у промислових і присадибних птахівничих господарствах, проводили у 3 етапи.

На першому етапі проводили первинну ідентифікацію ізолятів у ПЛР, а також перевіряли на відсутність контамінації іншими вірусами — збудниками інфекційних хвороб птиці. За результатами цих досліджень усі 7 ізолятів були ідентифіковані як вірус інфекційного ларинготрахеїту. Також встановлено, що ці ізоляти не містили інших вірусних збудників (вірусу ньюкаслської хвороби, грипу, інфекційного бронхіту, хвороби Гамборо, метапневмовірусної інфекції). Відсутність бактеріальної контамінації було підтверджено за результатами бактеріологічних досліджень.

Другим етапом було встановлення патотипу деяких ізолятів ІЛТ, тобто належність їх до вакциноподібних або польових ізолятів вірусу ІЛТ. У дослідженнях за цим етапом було залучено 4 ізоляти: Суми 6-11/19, А 04-12, В 59-11 та Б 2-10. Ці дослідження були проведені в Нідерландах в компанії GD. Результати наведені в таблиці 3.18.

Таблиця 3.18 — Результати визначення патотипу українських ізолятів вірусу ІЛТ

Ізолят	Місце виділення та рік	Патотип
Суми 6-11/19	Сумська область, 2019 рік промислове господарство	Вакциноподібний
А 04-12	Донецька область, 2012 рік, невелике промислове господарство	Вакциноподібний
В 59-11	Харківська область, 2011 рік, присадибне господарство	Польовий
Б 2-10	Луганська область, 2010 рік, промислове господарство	Вакциноподібний

Таким чином, нами встановлено, що в Україні у 2010–2019 роках циркулювали різні ізоляти вірусу інфекційного ларинготрахеїту. Із 4 ізолятів ІЛТ, які були задіяні у визначенні патотипу, більшість (три з чотирьох) належали до вакциноподібних ізолятів вірусу ІЛТ і тільки один — до польового вірусу. Необхідно зазначити, що всі вакциноподібні віруси були ізольовані від хворих і загиблих курей з промислових птахівничих господарств, де проводиться планова вакцинація проти ІЛТ у Сумській, Харківській та Донецькій областях. У той же час польовий вірус було ізольовано від загиблих курей із присадибного птахівничого господарства Харківської області, де вакцинація проти ІЛТ не проводиться.

Третім етапом досліджень було проведення секвенування ділянки гена. Для секвенування нами було відібрано два ізоляти вірусу інфекційного ларинготрахеїту: польовий ізолят В 59-11 (ізольований від хворих не вакцинованих проти ІЛТ курей із присадибного господарства Харківської

області у 2011 році) і вакциноподібний ізолят Б 2-10 (ізольований від хворих вакцинованих проти ІЛТ курей із промислового господарства Харківської області у 2010 році). Враховуючи той факт, що вірус інфекційного ларинготрахеїту має великий геном, ми обмежилися секвенуванням невеликої ділянки розміром 522 п. н. гена *US8*, який кодує оболонковий глікопротеїн Е вірусу інфекційного ларинготрахеїту.

Після проведення секвенування та отримання нуклеотидної послідовності нами було проведено філогенетичний аналіз з метою встановлення філогенетичних зв'язків цих двох українських ізолятів вірусу ІЛТ, які були ізольовані в різні роки в різних регіонах України. Результати цих досліджень представлені на рисунку 3.30.

За результатами філогенетичного аналізу ділянки гена тімідин-кінази українських вірусів інфекційного ларинготрахеїту встановлено, що ці віруси розташовані в окремих кластерах. Так, вакциноподібний ізолят Б 2-10 (виділений від вакцинованої птиці) увійшов до великого кластеру, в якому розташовані як польові, так і вакцинні віруси, що циркулювали в різних країнах світу (США, Китай, Італія). Цей український вірус споріднений з епізоотичним вірусом *US10*, який використовується у США, як контрольний епізоотичний вірус (Wild et al., 1996). Що стосується польового ізоляту вірусу ІЛТ В 59-11 (виділений від невакцинованих курей), то він розташований окремо від інших вірусів, у окремому кластері з польовим вірусом ІЛТ, який циркулював у Бразилії.

Нуклеотидні послідовності частини гена українських вірусів ІЛТ опубліковані в базі даних GenBank (номери доступу MZ323228, MZ333273) (Додатки А, Б). Отримані нами результати досліджень опубліковано у науковій праці (Veretsun et al., 2021).

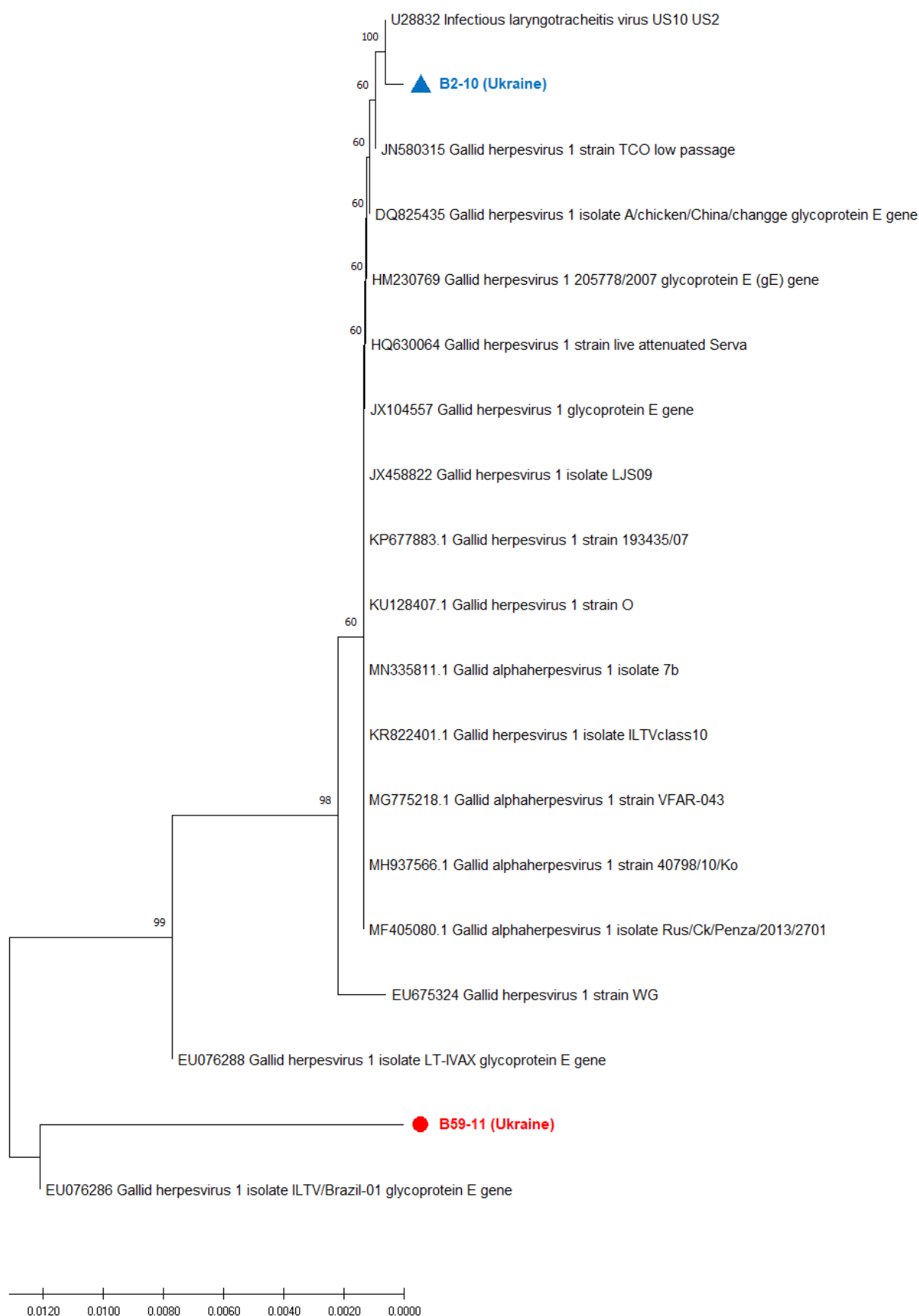


Рис. 3.30. Філогенетичні зв'язки українських ізолятів вірусу інфекційного ларинготрахеїту (ML Bootstrap 1000): ●▲ — українські ізоляти, вивчені в даній роботі.

3.4 Удосконалення серологічної діагностики інфекційного ларинготрахеїту

Після проведення серологічного моніторингу, вірусологічних досліджень та визначення епізоотичної ситуації, виділення вірусу, підтвердження циркуляції вірусу інфекційного ларинготрахеїту серед птахопоголів'я курей в Україні, а також вивчення біологічних та молекулярно-генетичних властивостей ізолятів від птиці, наступним етапом було вдосконалення серологічної діагностики ІЛТ методом ІФА, за рахунок розробки вітчизняної тест-системи. Ця робота також складалась з декількох етапів, а саме: одержання специфічних компонентів для ІФА тест-системи та визначення регламенту постановки реакції.

3.4.1 Одержання специфічних компонентів для імуноферментної тест-системи. *Накопичення та інактивація вірусу інфекційного ларинготрахеїту.* При роботі в рамках цього етапу ми враховували результати, отримані нами в попередніх дослідженнях щодо вивчення здатності культивуватися в КЕ.

Для накопичення вірусної сировини використовували ізоляти Б 2-10 та ЧП 96-10 та різні схеми. Результати наведено в таблиці 3.19.

Таблиця 3.19 — Накопичення вірусної маси штаму Б 2-10

Матеріал, який використали для зараження та його розведення	Кількість інфікованих КЕ	Термін спостереження та кількість КЕ, що загинули					
		24 год	48 год	72 год	96 год	120 год	Об'єм сировини
Б 2-10, 10^{-3}	6	1	-	-	-	1	ЕЕР+ХАО (30см ³)
Б 2-10, 10^{-4}	19	-	-	-	-	-	ЕЕР+ХАО (70см ³)
Б 2-10, 10^{-5}	15	-	-	-	-	1	Немає змін на ХАО
ЧП 96-10	49	1	4	2	-	-	ЕЕР+ХАО (220см ³)
Б 2-10	49	5	9	23	11	-	ЕЕР+ХАО (50см ³)

За результатами проведених досліджень встановлено, що оптимальною дозою для напрацювання вірусної сировини вірусу ІЛТ є доза 100-1000 ЕІД₅₀/0,1 см³, яка дозволяє отримати сировину хорошої якості та в достатній кількості. Також було встановлено, що необхідним є відбір не тільки екстраембріональної рідини, а і оболонок КЕ, що значно збільшує кінцевий вихід. Інактивацію вірусу ІЛТ проводили формальдегідом в кінцевій концентрації 0,5 %.

3.4.2 Отримання очищених концентрованих антигенів вірусів ІЛТ та визначення їх придатності для використання в якості компоненту тест-систем ІФА. Для дослідів з отримання очищеного антигену вірусу ІЛТ використовували ізоляти В 59-11, Б 2-10, ЧП 96-10 та А 04-12. Отриману вірусну сировину (екстраембріональну рідину та хоріоналантоїсні оболонки КЕ) заморожували та відтаювали тричі, гомогенізували, інактивували 0,5 % формальдегідом, освітлювали центрифугуванням при 3 000 об/хв протягом 20 хвилин, концентрували шляхом додавання ПЕГ-6000 до кінцевої концентрації 7 % протягом 18 годин за температури 4 °С. Осад відокремлювали центрифугуванням при 4 000 об/хв протягом 90 хвилин за температури 4 °С. Наступним етапом було очищення вірусу крізь 30 %-й розчин сахарози при 22000 g упродовж 4,5 годин за температури 4 °С. Отриманий осад після ультрацентрифугування ресуспендували в NTE-буфері (рН 7,5) у кількості 100 раз меншій від початкового об'єму.

За результатами експериментів виготовлено 4 зразки антигенів вірусу ІЛТ (таблиця 3.20).

Для перевірки на специфічність антигену використовували комерційні і виготовлені ННЦ «ІЕКВМ» позитивні сироватки крові проти вірусів інфекційної бурсальної хвороби (ІБХ), високопатогенного грипу птиці (ВПГП), ньюкаслської хвороби (НХ), інфекційного бронхіту курей (ІБК), аденовірусної інфекції курей 4 серотипу (АВП-4), метапневмовірусної інфекції (МПВІ), інфекційного енцефаломієліту (ІЕП).

Таблиця 3.20 — Характеристики очищених антигенів інфекційного ларинготрахеїту

Показники	Антиген			
	А 04-12	Б 2-10	ЧП 96-10	В 59-11
Вміст білка в антигені, мкг/см ³	1520	3500	3720	—
Концентрація білка в робочому розведенні антигену, мкг/см ³	20	10	15	—
Робоче розведення сироваток	1:400	1:400	1:400	1:400
ОГ позитивних контролів (М ± m)	0,574 ± 0,022	0,401 ± 0,020	0,443 ± 0,020	0,668 ± 0,005
ОГ негативних контролів (М ± m)	0,167 ± 0,002	0,112 ± 0,004	0,192 ± 0,002	0,187 ± 0,011
Співвідношення К+/К- ¹	3,44	3,58	2,31	3,57
Визначення специфічності				
Оптична густина К+ (ІБХ)	0,074 ± 0,012	0,112 ± 0,022	0,134 ± 0,004	0,165 ± 0,001
Оптична густина К+(НХ)	0,132 ± 0,004	0,144 ± 0,004	0,104 ± 0,004	0,119 ± 0,010
Оптична густина К+(ВІПІ)	—	—	—	0,159 ± 0,004
Оптична густина К+(ІБК)	0,152 ± 0,010	0,099 ± 0,002	0,112 ± 0,012	0,182 ± 0,010
Оптична густина К+(адено -4)	—	—	—	0,183 ± 0,012
Оптична густина К+(МІВ)	—	—	—	0,253 ± 0,012
Оптична густина К+(ІЕ)	—	—	—	0,238 ± 0,004

Примітка: ¹. — Співвідношення значень оптичної густини позитивної та негативної контрольних сироваток; «—» — не визначали.

Аналіз даних таблиці 2.27 свідчить про те, що оптична густина позитивних сироваток до вірусу ІЛТ більш ніж у 3 рази вище оптичної густини негативних контрольних сироваток. Показники оптичної густини сироваток до гетерологічних вірусів хвороб птиці були на рівні негативного контролю, тобто отримані нами антигени є специфічними. Таким чином, ми

встановили, що отримані нами антигени придатні для використання в якості компоненту тест-систем ІФА. Для подальшої роботи було обрано антиген В 59-11.

Результати даних досліджень висвітлені у науковій публікації (Верецун & Усова, 2021).

3.4.3 Визначення параметрів постановки реакції ІФА та виготовлення тест-системи для виявлення антитіл до вірусу ІЛТ.
Визначення оптимальних умов для сенсibilізації планшетів. При розробці тест-систем необхідно приділяти увагу не лише якості специфічних компонентів реакції (антиген, контрольні сироватки, кон'югат). Велике значення в ІФА мають також буферні системи, а також регламент постановки реакції. Тож, значну увагу було приділено підбору оптимальної буферної системи та режиму сенсibilізації. Після аналізу існуючих методик сенсibilізації та проведення експериментальних досліджень ми встановили, що 0,1М карбонатно-бікарбонатний буфер (pH 9,5) є оптимальним для сенсibilізації планшетів антигеном ІЛТ.

Що стосується часу та температури сорбції антигену на планшет, згідно з літературними даними, цю мету досягають двома способами: інкубація у термостаті за температури $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ протягом двох годин або інкубація в умовах побутового холодильника за температури $4 ^\circ\text{C}$ протягом 16–18-ти годин. Результати наших досліджень свідчать, що сенсibilізація планшетів антигеном вірусу ІЛТ в умовах побутового холодильника за температури $4 ^\circ\text{C}$ протягом 16–18-ти годин є оптимальною.

Підбір буферу для розведення дослідних і контрольних сироваток, імунопероксидазного кон'югату, міжетапних промивань та визначення регламенту постановки реакції ІФА. Після кожного етапу аналізу планшет промивають, позбавляючись від надлишків специфічних компонентів реакції. Розробники тест-систем ІФА пропонують використовувати різні буфери для розведення компонентів реакції (контрольних і дослідних сироваток, кон'югату) та міжетапних промивань, що, на нашу думку, дещо

ускладнює та здорожчує виготовлення тест-систем. Тому нами запропоновано використовувати тріс-HCl-буфер (pH 7,2–7,4) з 0,1 % твін-20 для розведення контрольних і дослідних сироваток і кон'югату та дистильовану воду — для міжетапних промивань.

Приготування обраного нами буферу не потребує спеціального обладнання, методично просто виконується; до того ж його можна зберігати за температури 4 °C протягом 1 року без змін властивостей. Результати наших досліджень свідчать, що використання для міжетапних промивань дистильованої води забезпечує добре відмивання незв'язаних компонентів реакції, відтворюваність та специфічність отриманих результатів.

Для створення оптимальних умов взаємодії специфічних компонентів важливу роль відіграє також температурно-часовий регламент реакції. За літературними даними рекомендований інтервал температур 20–40 °C, при тривалості інкубації 30–120 хвилин. Ми проводили інкубацію за температури 37 °C протягом 30 хвилин. Збільшення часу інкубації до 60 хвилин супроводжувалось зростанням величин оптичної щільності, але в той же час спостерігалось збільшення «фонового» забарвлення, зниження температури до 25 °C призводило до зниження показників оптичної щільності та зменшення співвідношення S/P. Урахувавши результати досліджень ми встановили, що оптимальним режимом інкубації є 30 хвилин за температури 37 °C.

Визначення робочого розведення антигену та кон'югату. Запорукою якості тест-систем ІФА є застосування якісного кон'югату, який повинен бути активним та стабільним. Тож, нами було обрано комерційний імунопероксидазний кон'югат Peroxidase-labeled antibody to chicken IgG (H+L) виробництва «KPL» (США), що здобув визнання серед виробників тест-систем ІФА зі всього світу.

Робочі розведення антигену та кон'югату визначали методом послідовних розведень препаратів за, так званою, «шаховою» блок-схемою (табл. 3.21).

Таблиця 3.21 — «Шахове» титрування антигену ІЛТ та антивидового імунопероксидазного кон'югату

Розведення кон'югату		Розведення антигену ІЛТ											
		1:500		1:1000		1:2000		1:3000		1:4000		1:5000	
1:1000	A	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:2000	C	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:3000	E	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:4000	G	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примітка: «+» - позитивна сироватка; «-» - негативна сироватка.

Для цього планшет було сенсibiliзовано антигеном вірусу ІЛТ у розведенні від 1:500 до 1:5000 та блоковано 1 % розчином БСА. Позитивну та негативну сироватки вносили по 100 мкл у розведенні 1:400. Інкубували планшет упродовж 30 хв за температури 37 °С та видаляли надлишок компонентів шляхом триразового промивання. Кон'югат вносили по 100 мкл. Всього було виготовлено 4 розведення кон'югату від 1:1000 до 1:4000. Інкубували планшет 30 хв за температури 37°С. В якості субстрату використовували ТМБ. Облік результатів проводили на рідері при довжині хвилі 450 нм. Результати реакції представлені в таблиці 3.22.

Таблиця 3.22 — Результати титрування антигену ІЛТ та кон'югату «KPL»

	Розведення антигену ІЛТ											
	1:500		1:1000		1:2000		1:3000		1:4000		1:5000	
A	0,588	0,371	0,421	0,286	0,313	0,246	0,318	0,231	0,268	0,211	0,351	0,3
B	0,526	0,488	0,442	0,476	0,298	0,418	0,346	0,319	0,293	0,246	0,314	0,364
C	0,298	0,229	0,288	0,21	0,21	0,166	0,212	0,157	0,198	0,154	0,189	0,169
D	0,299	0,334	0,307	0,282	0,256	0,252	0,24	0,216	0,223	0,174	0,218	0,212
E	0,198	0,175	0,231	0,175	0,203	0,15	0,195	0,137	0,17	0,14	0,155	0,145
F	0,222	0,204	0,241	0,244	0,202	0,165	0,207	0,164	0,177	0,147	0,141	0,145
G	0,213	0,179	0,191	0,16	0,17	0,118	0,156	0,123	0,153	0,121	0,145	0,119
H	0,235	0,223	0,21	0,242	0,164	0,173	0,155	0,17	0,137	0,132	0,141	0,138

За результатами, наведеними у таблиці 3.22, визначено, що оптимальне робоче розведення антигену ІЛТ та кон'югату — 1:1000.

Для підвищення стабільності кон'югату та подовження терміну його зберігання ми використовували розчин-стабілізатор «HRPStabilizer» виробництва «KPL», котрий дозволяє зберігати кон'югат у рідкому стані за температури 4 °С протягом року без суттєвого зниження активності.

Імобілізація антигену в лунках планшету. Використовували полістиролові плоскодонні планшети «Nunc-MaxiSorb» (Данія). У кожен лунку планшета вносили по 100 мкл розведеного 1:1000 антигену вірусу ІЛТ в 0,1М карбонатно-бікарбонатному буфері (рН 9,5). Інкубували протягом 16–18 год. за температури 4 °С. Після видалення антигену, що не зв'язався, для блокування вільних місць на твердій фазі у лунки вносили по 100 мкл 1 %-вого розчину БСА, витримували 1 год. за кімнатної температури. Надлишок компонентів видаляли шляхом трикратного промивання лунок дистильованою водою в об'ємі 350 мкл на лунку.

Одержання позитивних та негативних сироваток крові курей. Контрольна негативна сироватка була отримана від невакцинованих курчат з благополучного щодо інфекційних захворювань птиці господарства Дніпропетровської області.

У якості позитивної контрольної сироватки до вірусу ІЛТ було використано пул сироваток крові від вакцинованих курей з птахогосподарств Запорізької області, перевірених щодо титрів антитіл до ІЛТ за допомогою тест-системи ІФА «BioCheck ILT ELISA» (Великобританія).

Визначення робочого розведення дослідних та контрольних сироваток. За результатами багаторічних досліджень щодо розробки імуноферментних тест-систем для визначення титрів антитіл до збудників вірусних хвороб курей, співробітниками відділу з вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» встановлено, що оптимальним робочим розведенням дослідних і контрольних сироваток є розведення 1:400.

Тож, при розробці нашої тест-системи робочим розведенням сироваток було обрано 1:400.

У відповідності зі значеннями оптичної густини досліджуваних сироваток за допомогою комп'ютерної програми Statistica була побудована калібрувальна крива і виведене рівняння лінійної регресії для обрахунку титрів антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту у дослідних сироватках (рис. 3.31).

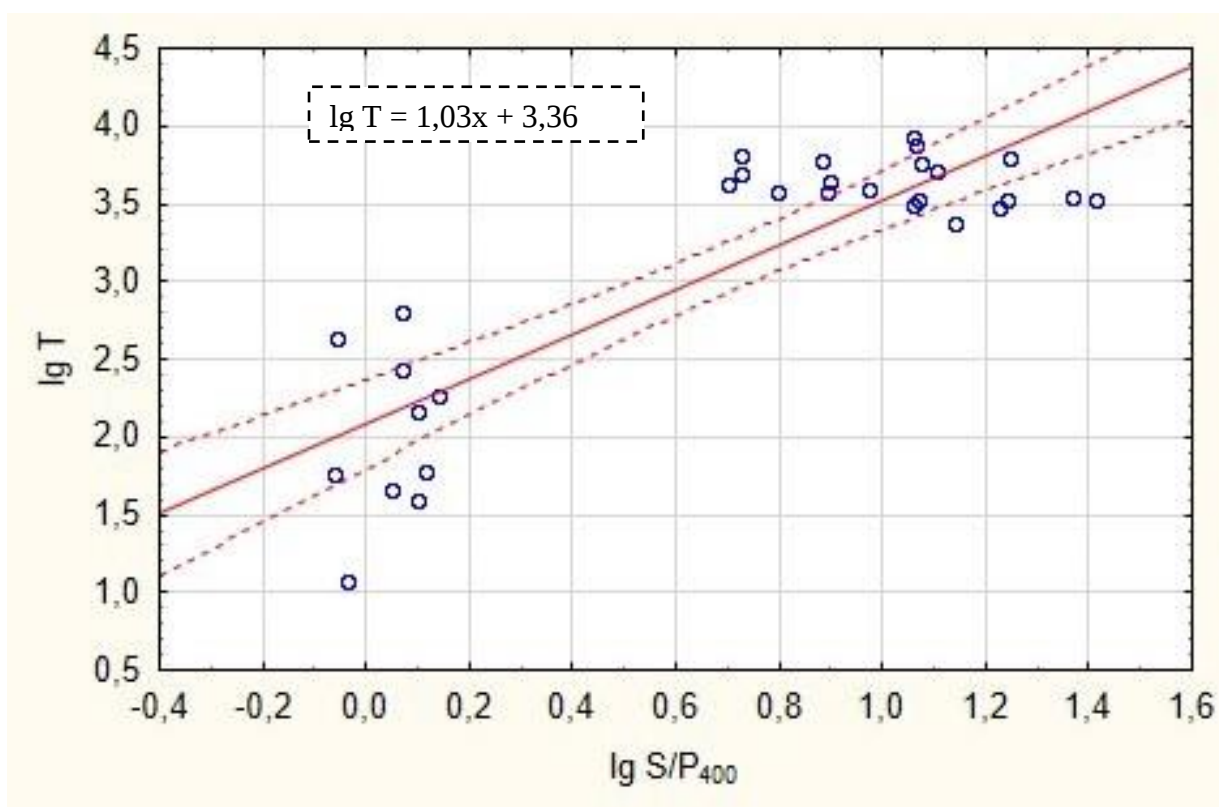


Рис. 3.31. Калібрувальна крива та рівняння для визначення числового значення титрів антитіл до ІЛТ.

Рівняння для розрахунку логарифмічного значення титру антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту у сироватках крові курей при тестуванні в одному розведенні мало вигляд:

$$\text{LgT} = 1,03 \lg (\text{S/P}_{400}) + 3,36$$

Визначення позитивно-негативного порогу тест-системи. Для отримання коректних результатів ІФА та об'єктивної оцінки імунної відповіді необхідно встановити позитивно-негативний поріг. З цією метою було досліджено 92 завідомо негативні сироватки крові від курчат з

птахофабрик Запорізької та Дніпропетровської областей, протестованих за допомогою тест-системи ІФА «BioCheck ILT ELISA» (Великобританія) на наявність антитіл до вірусу ІЛТ. В якості позитивного та негативного контролю використовували отримані нами контрольні сироватки.

Позитивно-негативний поріг визначали шляхом розрахунку середніх значень оптичної густини негативних сироваток з додаванням трьох значень стандартного відхилення. Отриманий результат визначає межу, яка віддзеркалює верхні 0,5 % негативних величин, якщо припустити нормальну оптичну густину негативних сироваток. Результати розрахунків наведені в таблиці 3.23.

Таблиця 3.23 — Стандартне відхилення розведень сироваток без антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту

Статистичні параметри	ОГ	S/P
Середнє значення (n=92)	0,207033	0,040651
Стандартне відхилення	0,051114	0,106377
Стандартна похибка	0,005329	0,011091
Мінімальне значення	0,119	-0,142560
Максимальне значення	0,336	0,309

За даними, наведеними в таблиці 2.30, видно, що середнє значення S/P негативних сироваток дорівнює 0,040651 при показнику стандартного відхилення 0,106377. Сума середнього значення S/P негативних сироваток та потроєного значення стандартного відхилення становила 0,097416.

Нижню межу позитивних значень визначали за формулою 3.2:

$$S/P_{\text{поз}} = M + 3\sigma,$$

де M — середнє значення S/P негативних сироваток;

σ — стандартне відхилення.

Тобто, $S/P_{\text{поз}} = 0,040651 + 3 \cdot 0,106377 = 0,360$

Таким чином, S/P, що відповідає нижньому позитивному титру антитіл до вірусу ІЛТ, дорівнює 0,360.

За формулою розраховували найменший позитивний титр.

$$\lg T_{\text{поз}} = 1,03 * (\lg S/P_{\text{поз}}) + 3,36 = 1,03 * \lg(0,040651 + 3 * 0,106377) + 3,36;$$

$$\text{звідки } T_{\text{поз}} = 800.$$

Таким чином, титр антитіл від 0 до 799 вважали негативним, а титр від 800 і вище — позитивним (таблиця 3.24).

Таблиця 3.24 — Порогові значення титру та S/P для ІЛТ

S/P	Титр	Результат
0 – 0,359	0 – 1:799	Негативний
0,360 і вище	1:800 і вище	Позитивний

Таким чином, нами було отримано усі специфічні компоненти діагностичної тест-системи для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту у сироватках крові курей на основі методу ІФА та відпрацьовано параметри постановки цієї реакції. Установлено, що оптимальне розведення антигену — 1:1000, кон'югату — 1:1000, дослідних та контрольних сироваток — 1:400. Розраховано математичне рівняння лінійної регресії для обчислення титру антитіл до інфекційного ларинготрахеїту в сироватках крові курей при дослідженні в одному розведенні. Визначено позитивно-негативний поріг для інтерпретації результатів ІФА (сироватки крові з титром антитіл до 799 включно вважали негативними, від 800 і більше — позитивними).

Визначення показників якості тест-системи «Набір компонентів для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом». Дослідження проводили з використанням виробничої панелі позитивних та негативних сироваток крові курей до вірусу інфекційного ларинготрахеїту. Результати наведені в таблицях 3.25, 3.26.

Таблиця 3.25 — Результати досліджень специфічності та чутливості тест-системи «Набір компонентів для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом»

№ сироватки	Тест-система (ННЦ «ІЕКВМ»)		«BioCheck ILT ELISA»	
	Титр	Результат	Титр	Результат
1	2432	+	8391	+
2	2878	+	6368	+
3	2464	+	5756	+
4	2536	+	5134	+
5	2832	+	4902	+
6	2451	+	3339	+
7	2040	+	3723	+
8	2628	+	6412	+
9	2432	+	3146	+
10	2226	+	3910	+
11	3161	+	3508	+
12	1595	+	2379	+
13	1643	+	4167	+
14	3267	+	3401	+
15	1809	+	3805	+
16	2868	+	3385	+
17	2010	+	6104	+
18	2448	+	7715	+
19	1653	+	3011	+
20	2049	+	4421	+
21	210	—	39	—
22	0	—	57	—
23	247	—	59	—
24	152	—	635	—
25	219	—	149	—
26	308	—	183	—
27	146	—	277	—
28	0	—	12	—
29	0	—	440	—
30	107	—	46	—

Примітка: «+» — сироватка позитивна щодо ІЛТ;
«-» — сироватка негативна щодо ІЛТ.

Таблиця 3.26 — Результати досліджень відтворюваності тест-системи «Набір компонентів для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом»

№ з/п	Оптична густина зразків сироватки	Відтворюваність, %	Примітка
1	0,199; 0,183; 0,172; 0,124; 0,209; 0,190; 0,245; 0,167; 0,155; 0,199; 0,211; 0,234; 0,173; 0,199; 0,160; 0,218; 0,190; 0,178; 0,187; 0,185	14,7	негативна сироватка

За даними, представленими у таблиці 3.25, при постановці реакції з 20 позитивними сироватками нашої внутрішньовиробничої панелі 20 прореагували позитивно, з 10 негативних сироваток нашої внутрішньовиробничої панелі 10 прореагували негативно.

Таким чином, специфічність та чутливість тест-системи за використання виробничої панелі сироваток становили 100 %.

Коефіцієнт кореляції між результатами, отриманими за допомогою розробленої тест-системи та закордонного аналогу (тест-системи «BioCheck ILT ELISA») становив 0,82821 ($p < 0,05$), що свідчило про високий ступінь кореляційного зв'язку.

Як видно з таблиці 3.26, відтворюваність, що визначалась за відсотком розбігу від середнього значення оптичної густини зразків однієї сироватки у 20 повторях, склала 14,7 % для негативної сироватки.

На «Тест-систему для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом» отримано патент України на корисну модель (Додаток В; Усова et al., 2021). Результати також представлені у тезах Верецун et al., 2024.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Птахівництво є однією з провідних галузей економіки не тільки в Україні, а й у світі. Птахівництво України постачає населенню продукти харчування, чим забезпечує продовольчу безпеку країни, створюються робочі місця для людей не тільки в цій галузі, а також в інших сумісних галузях сільського господарства. На сьогоднішній день однією з найбільших проблем промислового птахівництва у світі та Україні є інфекційні хвороби. Не дивлячись на величезні зусилля щодо вивчення біології збудників, розробки сучасних засобів ранньої діагностики та специфічної профілактики, спалахи інфекційних вірусних і бактеріальних захворювань реєструються практично постійно у різних країнах світу. На жаль, неможливо повністю викоринити інфекційні захворювання, вони постійно будуть супроводжувати живі організми у природі. Саме тому, єдиним виходом є проведення постійного спостереження за циркуляцією патогенів з постійним вдосконаленням заходів діагностики та специфічної профілактики.

Ключовим моментом контролю інфекційних агентів є їх виділення з подальшим вивченням біологічних і молекулярно-генетичних властивостей. У структурі інфекційних хвороб птиці особливе місце займають респіраторні вірусні захворювання. Респіраторні вірусні захворювання дуже часто ускладнюються бактеріальними інфекціями, що значно погіршує перебіг основного захворювання та призводить до підвищення економічних збитків. До таких респіраторних захворювань належить інфекційний ларинготрахеїт (Gowthaman et al., 2020; Vasudevan et al., 2016). Не дивлячись на сучасну діагностику, широку програму вакцинації, яка застосовується у промисловому птахівництві, хвороба залишається

актуальною проблемою. У дослідженнях Воротилової Н. було доведено, що збудник циркулює на території України навіть у господарствах, де проводять планову вакцинопрофілактику хвороби, тобто ІЛТ супроводжує промислове птахівництво в Україні вже багато років (Бабкін et al., 1997; Воротилова, 2014). У той же час, наші дослідження підтверджують, що циркуляція вірусу ІЛТ в птахівничих господарствах України продовжується — свідченням цього є позитивні результати серологічних досліджень птиці, а також виділення у 2019 році польового ізоляту вірусу ІЛТ від клінічно хворих курей. Усі ці дані свідчать, що збудник ІЛТ залишається значимим вірусним патогеном для птахівництва України.

Існує величезна кількість факторів, що допомагає цьому. До них належать активна міжнародна торгівля, яка сприяє циркуляції збудника. Крім того, особливості біології вірусу ІЛТ, здатність до латентної інфекції, а також рекомбінації вакцинних вірусів призводить до появи нових ізолятів, які можуть бути більш патогенними (Fakhri et al., 2019; Sabir et al., 2020), та мають своє походження від вакцинних вірусів. У наших дослідження ми також встановили, що деякі польові віруси ІЛТ були виділені в Україні від вакцинованих птахів. Це підтверджують і результати патотипування вірусних ізолятів, а також філогенетичний аналіз.

Аналізуючи наявні у нас дані щодо епізоотичної ситуації стосовно ІЛТ в Україні, можна сказати, що циркуляція вірусу ІЛТ серед свійської птиці в Україні продовжується. Наявність вірусу в малих присадибних господарствах також не можна виключати повністю. Доказом цього є виділений нами у 2019 році ізолят вірусу ІЛТ у присадибному господарстві в Сумській області. Тому, аналізуючи результати вірусологічних досліджень за останні 10 років в Україні, важливо відзначити, що циркуляція вірусу була виявлена як у промислових, так і у присадибних птахівничих господарствах різних областей України. Також не менш важливим є виявлення циркуляції вірусу серед вакцинованої птиці.

Нами вперше в Україні проведено визначення патотипу ізолятів вірусу ІЛТ та встановлено, що у птахівничих господарствах циркулюють як вакциноподібні, так і польові ізоляти вірусу. Необхідно зазначити, що вакциноподібні ізоляти вірусу ІЛТ було ізольовано не тільки від вакцинованої птиці з промислових господарств (ізолят В 2-10), а й від невакцинованої птиці (ізолят А 04-12). Ця інформація свідчить про той факт, що вакциноподібні ізоляти вірусу ІЛТ здатні поширюватися між птахівничими господарствами, чому може сприяти латентна інфекція ІЛТ (Fakhri et al., 2019; Sabir et al., 2020; Thilakarathne et al., 2020).

Виділення польового ізоляту вірусу ІЛТ від невакцинованих курей із присадибного господарства свідчить про активну циркуляцію вірусу ІЛТ у господарствах такого типу, а також про те, що саме присадибні господарства, де не завжди дотримуються ветеринарно-санітарних вимог, можуть відігравати важливу роль в підтриманні циркуляції патогенних ізолятів ІЛТ. Такі результати наших досліджень співпадають з даними інших дослідників з Ефіопії та Іраку (Odisho et al., 2015; Roba et al., 2020).

Також нами вперше в Україні було проведено часткове секвенування двох ізолятів вірусу ІЛТ (вакциноподібного та польового). Філогенетичний аналіз показав різне походження цих вірусів, а також показав нагальну необхідність продовження моніторингу цього захворювання з проведенням повногеномного секвенування ізолятів ІЛТ. Важливість проведення молекулярно-генетичних досліджень пов'язана з тим, що це дозволяє виявляти рекомбінації вакцинних вірусів, які врешті-решт призводять до появи нових більш вірулентних збудників у порівнянні з батьківськими штамами (Piccirillo et al., 2016). Такі роботи були проведені в Австралії (Blacker et al., 2011), США (Oldoni & García, 2007), Італії (Piccirillo et al., 2016), Китаї (Zhao et al., 2013), Кореї (La et al., 2019). Результати цих досліджень показують, що циркулюючі епізоотичні ізоляти генетично пов'язані з атенуйованими вакцинними вірусами, отриманими на курячих ембріонах, а також у деяких випадках з рекомбінантними вакцинами

(Norberg et al., 2015). Необхідно зосередити увагу, що цей напрямок досліджень також є важливим для України, бо в нашій країні використовується велика кількість різноманітних вакцин, у тому числі і на основі атенуйованих штамів вірусу ІЛТ.

Важливість моніторингу циркуляції та виділення ізолятів вірусу ІЛТ у птахівничих господарствах України також пов'язана з можливістю в подальшому використовувати ці місцеві ізоляти в якості виробничих штамів при виготовленні інактивованих вакцин для специфічної профілактики ІЛТ (Shahsavandi et al., 2017).

Уперше в Україні ми виявили, що ізоляти ІЛТ, виділені від птиці з промислових птахофабрик, були охарактеризовані як вакцинні штами. Слід також зазначити, що ізолят В 2 10 був отриманий від хворих вакцинованих птахів, а ізолят А 04-12 — від хворих невакцинованих курей. Ця інформація свідчить про те, що вакцинні штами здатні поширюватися між птахофабриками, тому необхідне більш детальне дослідження та постійний контроль циркуляції вірусу ІЛТ. У наших дослідженнях вакциноподібні ізоляти ІЛТ (А 04-12 та В 2-10), виділені в різних регіонах України у 2010 та 2012 роках, показали високу здатність до культивування в КЕ та були для них патогенними. Вони викликали типові зміни хоріоалантоїсної оболонки. Таким чином, отримані нами дані узгоджуються з даними інших дослідників (Saif & Fadly, 2008).

Під час експериментального зараження обидва ізоляти були патогенними також і для 60-добових курчат. За нашими даними, інкубаційний період, викликаний вакциноподібними ізолятами вірусу ІЛТ у курей варіював від 7 до 9 днів, що узгоджується з даними інших авторів (Saif & Fadly, 2008). Українські ізоляти вірусу ІЛТ (А 04-12 та В 2-10) викликали у птиці не лише типові клінічні ознаки, а й загибель курчат (В 2-10) протягом 12 діб після зараження. Ці результати підтверджують здатність вакциноподібних ізолятів вірусу ІЛТ викликати захворювання у сприйнятливих курей (Hughes et al., 1989; Hughes et al., 1987). Що

стосується патологоанатомічних досліджень, то виявлені нами зміни в тканинах внутрішніх органів, особливо в дихальній системі, свідчать про те, що вакциноподібні ізоляти вірусу ІЛТ можуть завдати значної шкоди органам на клітинному рівні. У той же час, ми також виявили реакцію імунної системи курей на інфекцію. На основі отриманих даних можна зробити висновок, що вакциноподібні ізоляти ІЛТ можуть бути патогенними для птахів, викликати у них клінічні прояви захворювання та загибель інфікованих курчат. Таким чином, не існує ефективного методу диференціації між вакциноподібними та польовими ізолятами вірусу без проведення поглиблених молекулярно-генетичних досліджень та секвенування. Рівень патогенності вакциноподібних ізолятів може бути різним, і ключовими факторами погіршення захворювання у птиці будуть зовнішні фактори (ветеринарно-санітарний стан птахофабрик, якість корму та інші інфекції, особливо бактеріальні).

Отримані нами результати досліджень вірусу ІЛТ підтверджують раніше зроблені висновки про небезпеку цього захворювання для птахівництва України (Воротілова, 2014; Стегній & Воротілова, 2012, 2013; Стегній et al., 2013b, 2013c).

У контексті отриманих даних епізоотологічного моніторингу, вірусологічних та молекулярно-генетичних досліджень важливим також є удосконалення вітчизняної діагностики інфекційного ларинготрахеїту. Ураховуючи той факт, що зараз усі серологічна діагностика ІЛТ здійснюється за допомогою ІФА з використанням комерційних закордонних тест-систем, розробка вітчизняної технології виготовлення тест-системи має велике значення. У наших дослідженнях було використано попередній досвід розробки вітчизняних тест-систем для виявлення антитіл до збудників інфекційних хвороб за допомогою ІФА: вірусного ентериту гусей (Музика, 2011), інфекційного бронхіту курей (Усова, 2016), метапневмовірусної інфекції (Івлева, 2019), отримання очищених антигенів для ІФА збудника респіраторного мікоплазмозу (Стегній et al., 2013a). У

результаті серії експериментальних досліджень була вдосконалена лабораторна діагностика інфекційного ларинготрахеїту за рахунок використання вітчизняного ізоляту для отримання інактивованого очищеного антигену.

ВИСНОВКИ

1. У дисертаційній роботі представлені дані широкомасштабного епізоотологічного моніторингу циркуляції вірусу інфекційного ларинготрахеїту серед курей промислових та присадибних птахівничих господарств України, виділення та вивчення біологічних властивостей українських ізолятів вірусу ІЛТ, результати патотипування, секвенування та філогенетичного аналізу українських ізолятів вірусу ІЛТ, а також на основі вітчизняного штаму розроблено технологію отримання очищеного та концентрованого антигену вірусу ІЛТ, що дозволило вдосконалити серологічну лабораторну діагностику.

2. За результатами аналізу наукової літератури встановлено, що вірус ІЛТ є достатньо розповсюдженим у світі, спалахи цього захворювання регулярно реєструються в різних країнах. В Україні в період 2010–2021 років реєстрували активну циркуляцію вірусу інфекційного ларинготрахеїту серед курей різного віку в промислових та присадибних птахівничих господарствах 6 областей України (Харківської, Черкаської, Донецької, Хмельницької, Луганської, Херсонської). Установлено суттєві коливання рівня антитіл та напруженості імунітету (від 4 до 100 %) у невакцинованої проти ІЛТ птиці. Проведений аналіз клінічних випадків захворювання птиці в птахівничих господарствах дозволив встановити, що захворювання з клінічними ознаками, характерними для ІЛТ, реєструвалося в Україні в 2010, 2011, 2019 роках як у птиці з промислових господарств, де проводиться планова вакцинація проти ІЛТ, так і у невакцинованої птиці з присадибних господарств. Здебільшого у птиці реєстрували респіраторні розлади, розлади загального стану або раптову загибель.

3. За результатами вірусологічних досліджень біологічного матеріалу, який було зібрано в період 2010–2019 років, виділено 7 польових ізолятів. Зі 7 ізолятів більшість — 5 вірусних ізолятів (Б 2-10, ЧП 96-10, Х 2-12, КДС,

А 04-12) — було ізольовано від птиці з промислових птахівничих господарств і тільки два (В 59-11 та Суми/6-11/19) — від птиці з присадибних господарств. Також п'ять вірусів (Б 2-10, ЧП 96-10, Х 2-12, КДС, Суми/6-11/19) було виділено від птиці, яка вакцинувалася проти ІЛТ відповідно до схеми вакцинації. У той же час, тільки два віруси (В 59-11 та А 04-12) було виділено від хворих курей, які не вакцинувалися проти ІЛТ.

4. Під час вивчення біологічних властивостей установлено, що усі українські ізоляти вірусу ІЛТ не спричиняють аглютинацію еритроцитів півня, достатньо активно репродукуються в курячих ембріонах, спричинюючи в них типові патологоанатомічні зміни та загибель. Установлено, що найбільш активним у репродукції в КЕ з найвищим інфекційним титром був ізолят В 59-11, виділений від невакцинованої птиці з присадибного птахівничого господарства у 2011 році. Він також мав і найбільший летальний титр для КЕ, що свідчить про його патогенність до КЕ. Що стосується інших ізолятів, то їхній інфекційний титр був приблизно однаковим $5,0\text{--}5,5 \lg \text{ЕІД}_{50/0,1 \text{ см}^3}$, летальний титр коливався в межах $3,46\text{--}4,0 \lg \text{ЕЛД}_{50/0,1 \text{ см}^3}$, за виключенням ізоляту А 04-12, летальний титр якого був $2,5 \lg \text{ЕЛД}_{50/0,1 \text{ см}^3}$.

5. За результатами біопроби на чутливих курчатах встановлено, що за інтратрахеального інфікування польові ізоляти ІЛТ здатні спричиняти захворювання та загибель у чутливих курчат. Установлено, що ознаки захворювання (загальне пригнічення, діарея, респіраторні шуми, утруднене дихання) спостерігали в усіх експериментах, починаючи з 8–10-ї доби. Захворюваність становила 100 % експериментально інфікованого поголів'я. За інфікування ізолятами Б 2-10, ЧП 96-10 специфічну загибель птиці спостерігали, починаючи з 12–13-ї доби. У цих експериментах загибель становила 40 %. Наприкінці дослідів (15-та доба) загинуло 80 % птиці, інфікованої ізолятом ЧП 96-10. За розтину загиблих курчат реєстрували характерні для ІЛТ патологоанатомічні зміни. Під час експериментального дослідження ізоляту А 04-12 було встановлено, що ознаки захворювання

(загальне пригнічення, діарея, респіраторні шуми, утруднене дихання) виявляли у курей обох груп птиці з 8-ї доби досліду. Загибель курчат була відсутня упродовж усього терміну спостережень. На 15-ту добу було проведено вимушений забій піддослідної птиці. Під час розтину виявляли патологічні (катаральний трахеїт, гіперплазія та гіперемія селезінки) та типові гістологічні зміни, які є характерними для вірусу ІЛТ.

6. За результатами патотипування українських ізолятів вірусу ІЛТ встановлено, що в Україні у 2010–2019 роках циркулювали різні ізоляти. Із 4 ізолятів ІЛТ, які були задіяні у визначенні патотипу, більшість (три з чотирьох) належали до вакциноподібних ізолятів і тільки один — до польового вірусу. Необхідно зазначити, що всі вакциноподібні віруси були ізольовані від хворих і загиблих курей з промислових птахівничих господарств, де проводиться планова вакцинація проти ІЛТ у Сумській, Харківській та Донецькій областях. У той же час, польовий вірус було ізольовано від загиблих курей із присадибного птахівничого господарства Харківської області, де вакцинація проти ІЛТ не проводиться.

7. За результатами секвенування та філогенетичного аналізу ділянки гена українських вірусів інфекційного ларинготрахеїту встановлено, що ці віруси розташовані в окремих кластерах. Так, вакциноподібний ізолят Б 2-10 (виділений від вакцинованої птиці) увійшов до великого кластеру, в якому розташовані як польові, так і вакцинні віруси, що циркулювали в різних країнах світу (США, Китай, Італія). Цей український вірус споріднений з епізоотичним вірусом US10, який використовується у США як контрольний епізоотичний вірус. Що стосується польового ізоляту вірусу ІЛТ В 59-11 (виділеного від невакцинованих курей), то він розташований окремо від інших вірусів, в окремому кластері та споріднений з польовим вірусом ІЛТ, який циркулював у Бразилії. Нуклеотидні послідовності частини гена українських вірусів ІЛТ опубліковані в базі даних GenBank (номери доступу MZ323228, MZ333273).

8. За результатами експериментальних досліджень підібрана методика виготовлення очищеного та концентрованого антигену вірусу ІЛТ, яка включає отримання вірусної сировини (екстраембріональної рідини та хоріонлантоїсної оболонки КЕ), триразове заморожування та відтаювання, гомогенізацію, інактивацію 0,5 %-м формальдегідом, освітлення низькошвидкісним центрифугуванням за 3 000 об./хв протягом 20 хв, концентрування шляхом додавання ПЕГ-6000 до кінцевої концентрації 7 % протягом 18 год за температури 4 °С, з подальшим відокремлювання осаду за 4 000 об./хв протягом 90 хв за температури 4 °С. На завершальному етапі проводиться очищення вірусного антигену крізь 30 %-й розчин сахарози за 22 000 g упродовж 4,5 год за температури 4 °С. Отриманий осад після ультрацентрифугування ресуспендується в NTE-буфері (рН 7,5) у кількості у 100 разів меншій від початкового об'єму. У результаті отримуються очищені антигени з концентрацією білка 1520–3720 мкг/см³. Визначено, що оптимальним є ізолят В 59-11, який і було обрано для подальших досліджень.

9. Визначено оптимальне розведення антигену ІЛТ і кон'югату (1:1000) та дослідних сироваток (1:400). Розраховано математичне рівняння лінійної регресії для обчислення титру антитіл до вірусу ІЛТ у сироватках крові курей за дослідження в одному розведенні. Визначено позитивно-негативний поріг для інтерпретації результатів ІФА (сироватки крові з титром антитіл 0–1:799 вважаються негативними, а 1:800 і вище — позитивними).

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для практики ветеринарної медицини запропоновано:

1. «Набір компонентів для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту курей імуноферментним методом» для проведення моніторингу та оцінки ефективності вакцинопрофілактики щодо ІЛТ.
2. Штами та ізоляти вірусу інфекційного ларинготрахеїту, які можуть бути використані для виробництва ветеринарних біопрепаратів та проведення наукових досліджень.
3. Отримані результати наукових досліджень рекомендуються до використання під час підготовки здобувачів вищої освіти за спеціальністю «Ветеринарна медицина» у закладах вищої освіти України.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Adzhar, A., Shaw, K., Britton, P., & Cavanagh, D. (1996). Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *Avian Pathology*, 25(4), 817–836. <https://doi.org/10.1080/03079459608419184>.
2. Agnew-Crumpton, R., Vaz, P. K., Devlin, J. M., O'Rourke, D., Blacker-Smith, H. P., Konsak-Ilievski, B., Hartley, C. A., & Noormohammadi, A. H. (2016). Spread of the newly emerging infectious laryngotracheitis viruses in Australia. *Infection, Genetics and Evolution*, 43, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.023>.
3. Alaraji, F., Hammadi, H., Abed, A. A., & Khudhair, Y. I. (2019). Molecular detection and phylogenetic tree of infectious laryngotracheitis virus in layers in Al-Diwaniyah province, Iraq. *Veterinary World*, 12(4), 605–608. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.605-608>.
4. Andreasen, J. R., Jr, Glisson, J. R., & Villegas, P. (1990). Differentiation of vaccine strains and Georgia field isolates of infectious laryngotracheitis virus by their restriction endonuclease fragment patterns. *Avian Diseases*, 34(3), 646–656. <https://doi.org/10.2307/1591259>.
5. Aziz, T. (2010). Infectious Laryngotracheitis (ILT) targets broilers. *World Poultry*, 25(6), 17–18. https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/laringotraqueitis_infecciosa.pdf.
6. Bagust T. J. (1986). Laryngotracheitis (Gallid-1) herpesvirus infection in the chicken. 4. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus. *Avian Pathology*, 15(3), 581–595. <https://doi.org/10.1080/03079458608436317>.
7. Bagust, T. J., & Johnson, M. A. (1995). Avian infectious laryngotracheitis: virus-host interactions in relation to prospects for eradication. *Avian Pathology*, 24(3), 373–391. <https://doi.org/10.1080/03079459508419079>.

8. Bagust, T. J., Jones, R. C., & Guy, J. S. (2000). Avian infectious laryngotracheitis. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 19(2), 483–492. <https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1229>.
9. Barhoom, S., & Dalab, A. (2012). Molecular diagnosis of explosive outbreak of Infectious Laryngotracheitis (ILT) by polymerase chain reaction in Palestine. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*, 36(s2), 104–109. <https://www.researchgate.net/publication/257638605>.
10. Beltrán, G., Williams, S. M., Zavala, G., Guy, J. S., & García, M. (2017). The route of inoculation dictates the replication patterns of the infectious laryngotracheitis virus (ILTV) pathogenic strain and chicken embryo origin (CEO) vaccine. *Avian Pathology*, 46(6), 585–593. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1331029>.
11. Blacker, H. P., Kirkpatrick, N. C., Rubite, A., O'Rourke, D., & Noormohammadi, A. H. (2011). Epidemiology of recent outbreaks of infectious laryngotracheitis in poultry in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 89(3), 89–94. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2010.00665.x>.
12. Blakey, J., Stoute, S., Crossley, B., & Mete, A. (2019). Retrospective analysis of infectious laryngotracheitis in backyard chicken flocks in California, 2007-2017, and determination of strain origin by partial ICP4 sequencing. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 31(3), 350–358. <https://doi.org/10.1177/1040638719843574>.
13. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
14. Callison, S. A., Riblet, S. M., Oldoni, I., Sun, S., Zavala, G., Williams, S., Resurreccion, R. S., Spackman, E., & García, M. (2007). Development and validation of a real-time Taqman PCR assay for the detection and quantitation of infectious laryngotracheitis virus in poultry. *Journal of Virological Methods*, 139(1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.09.001>.

15. Cardone, G., Winkler, D. C., Trus, B. L., Cheng, N., Heuser, J. E., Newcomb, W. W., Brown, J. C., & Steven, A. C. (2007). Visualization of the herpes simplex virus portal in situ by cryo-electron tomography. *Virology*, 361(2), 426–434. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.10.047>.
16. Chacón, J. L., & Ferreira, A. J. (2009). Differentiation of field isolates and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus by DNA sequencing. *Vaccine*, 27(48), 6731–6738. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.08.083>.
17. Chang, P. W., Jasty, V., Fry, D., & Yates, V. J. (1973). Replication of a cell-culture-modified infectious laryngotracheitis virus in experimentally infected chickens. *Avian Diseases*, 17(4), 683–689. <https://doi.org/10.2307/1589034>.
18. Chang, P. W., Sculco, F., & Yates, V. J. (1977). An in vivo and in vitro study of infectious laryngotracheitis virus in chicken leukocytes. *Avian Diseases*, 21(4), 492–500. <https://doi.org/10.2307/1589407>.
19. 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. *Journal of Virological Methods*, 66(2), 179–186. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(97\)00050-5](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(97)00050-5).
20. Coppo, M. J., Hartley, C. A., & Devlin, J. M. (2013a). Immune responses to infectious laryngotracheitis virus. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(3), 454–462. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.03.022>.
21. Coppo, M. J., Noormohammadi, A. H., Browning, G. F., & Devlin, J. M. (2013b). Challenges and recent advancements in infectious laryngotracheitis virus vaccines. *Avian Pathology*, 42(3), 195–205. <https://doi.org/10.1080/03079457.2013.800634>.
22. Couto, R. de M., Preis, I. S., Braga, J. F., Brasil, B. S., Drummond, M. G., Martins, N. R., & Ecco, R. (2015). Molecular characterization of infectious laryngotracheitis virus in naturally infected egg layer chickens in a multi-age flock in Brazil. *Archives of Virology*, 160(1), 241–252. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2273-2>.

23. Cover, M. S. (1996). The early history of infectious laryngotracheitis. *Avian Diseases*, 40(3), 494–500. <https://doi.org/10.2307/1592256>.
24. Craig, M. I., Rojas, M. F., van der Ploeg, C. A., Olivera, V., Vagnozzi, A. E., Perez, A. M., & König, G. A. (2017). Molecular characterization and cluster analysis of field isolates of avian infectious laryngotracheitis virus from Argentina. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, 212. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00212>.
25. Crawshaw, G. J., & Boycott, B. R. (1982). Infectious laryngotracheitis in peafowl and pheasants. *Avian Diseases*, 26(2), 397–401. <https://doi.org/10.2307/1590111>.
26. Creelan, J. L., Calvert, V. M., Graham, D. A., & McCullough, S. J. (2006). Rapid detection and characterization from field cases of infectious laryngotracheitis virus by real-time polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Avian Pathology*, 35(2), 173–179. <https://doi.org/10.1080/03079450600598244>.
27. Crowther, J. R. (2000). *The ELISA Guidebook*. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1592590497>.
28. Davidson, I., Raibstein, I., & Altory, A. (2015). Differential diagnosis of fowlpox and infectious laryngotracheitis viruses in chicken diphtheritic manifestations by mono and duplex real-time polymerase chain reaction. *Avian Pathology*, 44(1), 1–4. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.977223>.
29. Davison, S., Smith, G., & Eckroade, R. J. (1989). Laryngotracheitis in chickens: the length of the preinfectious and infectious periods. *Avian Diseases*, 33(1), 18–23. <https://doi.org/10.2307/1591062>.
30. Davison, A. J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G. S., McGeoch, D. J., Minson, A. C., Pellett, P. E., Roizman, B., Studdert, M. J., & Thiry, E. (2009). The order Herpesvirales. *Archives of Virology*, 154(1), 171–177. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4>.
31. Devlin, J. M., Browning, G. F., Hartley, C. A., Kirkpatrick, N. C., Mahmoudian, A., Noormohammadi, A. H., & Gilkerson, J. R. (2006).

Glycoprotein G is a virulence factor in infectious laryngotracheitis virus. *The Journal of General Virology*, 87(10), 2839–2847. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82194-0>.

32. Devlin, J. M., Viejo-Borbolla, A., Browning, G. F., Noormohammadi, A. H., Gilkerson, J. R., Alcamí, A., & Hartley, C. A. (2010). Evaluation of immunological responses to a glycoprotein G deficient candidate vaccine strain of infectious laryngotracheitis virus. *Vaccine*, 28(5), 1325–1332. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.013>.

33. Devlin, J. M., Hartley, C. A., Gilkerson, J. R., Coppo, M. J., Vaz, P., Noormohammadi, A. H., Wells, B., Rubite, A., Dhand, N. K., & Browning, G. F. (2011). Horizontal transmission dynamics of a glycoprotein G deficient candidate vaccine strain of infectious laryngotracheitis virus and the effect of vaccination on transmission of virulent virus. *Vaccine*, 29(34), 5699–5704. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.002>.

34. Dormitorio, T. V., Giambrone, J. J., & Macklin, K. S. (2013). Detection and isolation of infectious laryngotracheitis virus on a broiler farm after a disease outbreak. *Avian diseases*, 57(4), 803–807. <https://doi.org/10.1637/10544-032913-ResNote.1>.

35. Dufour-Zavala, L. (ed.). (2008a). *A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens* (5th ed.). American Association of Avian Pathologists. https://www.aaap.info/index.php?option=com_content&view=article&id=141.

36. Dufour-Zavala L. (2008b). Epizootiology of infectious laryngotracheitis and presentation of an industry control program. *Avian Diseases*, 52(1), 1–7. <https://doi.org/10.1637/8018-051007-Review>.

37. Fakhri, O., Hartley, C. A., Devlin, J. M., Browning, G. F., Noormohammadi, A. H., & Lee, S. W. (2019). Development and application of high-resolution melting analysis for the classification of infectious laryngotracheitis virus strains and detection of recombinant progeny. *Archives of Virology*, 164(2), 427–438. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-4086-1>.

38. Falchieri, M., Brown, P. A., Catelli, E., & Naylor, C. J. (2012). Avian metapneumovirus RT-nested-PCR: a novel false positive reducing inactivated control virus with potential applications to other RNA viruses and real time methods. *Journal of Virological Methods*, 186(1–2), 171–175. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.07.013>.
39. Fuchs, W., & Mettenleiter, T. C. (1996). DNA sequence and transcriptional analysis of the UL1 to UL5 gene cluster of infectious laryngotracheitis virus. *The Journal of General Virology*, 77(9), 2221–2229. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-9-2221>.
40. Fuchs, W., Veits, J., Helferich, D., Granzow, H., Teifke, J. P., & Mettenleiter, T. C. (2007). Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. *Veterinary Research*, 38(2), 261–279. <https://doi.org/10.1051/vetres:200657>.
41. Fukui, D., Nakamura, M., Yamaguchi, T., Takenaka, M., Murakami, M., Yanai, T., Fukushi, H., Yanagida, K., Bando, G., Matsuno, K., Nagano, M., & Tsubota, T. (2016). An epizootic of emerging novel avian pox in carrion crows (*Corvus corone*) and large-billed crows (*Corvus macrorhynchos*) in Japan. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(2), 230–241. <https://doi.org/10.7589/2015-07-172>.
42. García M. (2017). Current and future vaccines and vaccination strategies against infectious laryngotracheitis (ILT) respiratory disease of poultry. *Veterinary Microbiology*, 206, 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.023>.
43. García, M., & Riblet, S. M. (2001). Characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates: demonstration of viral subpopulations within vaccine preparations. *Avian Diseases*, 45(3), 558–566. <https://doi.org/10.2307/1592895>.
44. García, M., Spatz, S., & Guy, J. S. (2013). Infectious laryngotracheitis. In D. E. Swayne (Ed.), *Diseases of Poultry* (13th ed., pp. 161–179). Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781119421481.ch5>.

45. Giambrone, J., Fagbohun, O., & Macklin, K. (2008). Management practices to reduce infectious laryngotracheitis virus in poultry litter. *Journal of Applied Poultry Research*, 17(1), 64–68. <https://doi.org/10.3382/japr.2007-00017>.
46. Gibbs, C. S. (1934). *Infectious Laryngotracheitis Vaccination*. Massachusetts State College.
47. Godoy, A., Icard, A., Martinez, M., Mashchenko, A., García, M., & El-Attrachea, J. (2013). Detection of infectious laryngotracheitis virus antibodies by glycoprotein-specific ELISAs in chickens vaccinated with viral vector vaccines. *Avian Diseases*, 57(s2), 432–436. <https://doi.org/10.1637/10345-090312-Reg.1>.
48. Goraya, M. U., Ali, L., & Younis, I. (2017). Innate immune responses against avian respiratory viruses. *Hosts and Viruses*, 4(5), 78–87. <https://doi.org/10.17582/journal.hv/2017/4.5.78.87>.
49. Gowthaman, V., Singh, S. D., Dhama, K., Barathidasan, R., Mathapati, B. S., Srinivasan, P., Saravanan, S., & Ramakrishnan, M. A. (2014). Molecular detection and characterization of infectious laryngotracheitis virus (Gallid herpesvirus-1) from clinical samples of commercial poultry flocks in India. *VirusDisease*, 25(3), 345–349. <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0206-z>.
50. Gowthaman, V., Koul, M., & Kumar, S. (2016). Avian infectious laryngotracheitis: A neglected poultry health threat in India. *Vaccine*, 34(36), 4276–4277. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.07.002>.
51. Gowthaman, V., Kumar, S., Koul, M., Dave, U., Murthy, T. R. G. K., Munuswamy, P., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., Michalak, I., & Joshi, S. K. (2020). Infectious laryngotracheitis: Etiology, epidemiology, pathobiology, and advances in diagnosis and control - a comprehensive review. *The Veterinary Quarterly*, 40(1), 140–161. <https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1759845>.
52. Granzow, H., Klupp, B. G., Fuchs, W., Veits, J., Osterrieder, N., & Mettenleiter, T. C. (2001). Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *Journal of Virology*, 75(8), 3675–3684. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.8.3675-3684.2001>.

53. Guo, P., Scholz, E., Turek, J., Nodgreen, R., & Maloney, B. (1993). Assembly pathway of avian infectious laryngotracheitis virus. *American Journal of Veterinary Research*, 54(12), 2031–2039. <https://doi.org/10.2460/ajvr.1993.54.12.2031>.
54. Guy, J. S., & García, M. (2008). Laryngotracheitis. In Y. M. Saif (Ed.), *Diseases of Poultry* (12th ed., pp. 137–152). Blackwell Publishing.
55. Guy, J. S., Barnes, H. J., & Morgan, L. M. (1990). Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates. *Avian Diseases*, 34(1), 106–113. <https://doi.org/10.2307/1591340>.
56. Guy, J. S., Barnes, H. J., & Smith, L. G. (1992). Rapid diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure. *Avian Pathology*, 21(1), 77–86. <https://doi.org/10.1080/03079459208418820>.
57. Hayashi, S., Odagiri, Y., Kotani, T., & Horiuchi, T. (1985). Pathological changes of tracheal mucosa in chickens infected with infectious laryngotracheitis virus. *Avian Diseases*, 29(4), 943–950. <https://doi.org/10.2307/1590447>.
58. Hernandez-Divers, S. M., Villegas, P., Jimenez, C., Hernandez-Divers, S. J., Garcia, M., Riblet, S. M., Carroll, C. R., O'Connor, B. M., Webb, J. L., Yabsley, M. J., Williams, S. M., & Sanchez, S. (2008). Backyard chicken flocks pose a disease risk for neotropical birds in Costa Rica. *Avian Diseases*, 52(4), 558–566. <https://doi.org/10.1637/8298-032808-Reg.1>.
59. Hidalgo, H. (2003). Infectious laryngotracheitis: a review. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 5(3), 157–168. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2003000300001>.
60. Hitchner, S. B., Fabricant, J., & Bagust, T. J. (1977). A fluorescent-antibody study of the pathogenesis of infectious laryngotracheitis. *Avian Diseases*, 21(2), 185–194. <https://doi.org/10.2307/1589339>.

61. Hnasko, R. (Ed.). (2015). *ELISA: Methods and Protocols*. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5>.
62. Hughes, C. S., & Jones, R. C. (1988). Comparison of cultural methods for primary isolation of infectious laryngotracheitis virus from field material. *Avian Pathology*, 17(2), 295–303. <https://doi.org/10.1080/03079458808436448>.
63. Hughes, C. S., Jones, R. C., Gaskell, R. M., Jordan, F. T., & Bradbury, J. M. (1987). Demonstration in live chickens of the carrier state in infectious laryngotracheitis. *Research in Veterinary Science*, 42(3), 407–410. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)30726-4](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)30726-4).
64. Hughes, C. S., Gaskell, R. M., Jones, R. C., Bradbury, J. M., & Jordan, F. T. (1989). Effects of certain stress factors on the re-excretion of infectious laryngotracheitis virus from latently infected carrier birds. *Research in Veterinary Science*, 46(2), 274–276. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)31158-5](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31158-5).
65. Hughes, C. S., Williams, R. A., Gaskell, R. M., Jordan, F. T., Bradbury, J. M., Bennett, M., & Jones, R. C. (1991). Latency and reactivation of infectious laryngotracheitis vaccine virus. *Archives of Virology*, 121(1–4), 213–218. <https://doi.org/10.1007/BF01316755>.
66. Humberd, J., García, M., Riblet, S. M., Resurreccion, R. S., & Brown, T. P. (2002). Detection of infectious laryngotracheitis virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, 46(1), 64–74. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0064:DOILVI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0064:DOILVI]2.0.CO;2).
67. Ide P. R. (1978). Sensitivity and specificity of the fluorescent antibody technique for detection of infectious laryngotracheitis virus. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 42(1), 54–62. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1277791>.
68. Johnson, Y., Gedamu, N., Colby, M., Myint, M., Steele, S., Salem, M., & Tablante, N. (2005). Wind-borne transmission of infectious laryngotracheitis between commercial poultry operations. *International Journal of Poultry Science*, 4(5), 263–267. <https://doi.org/10.3923/ijps.2005.263.267>.

69. Jones R. C. (2010). Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): are they ever under control?. *British Poultry Science*, 51(1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/00071660903541378>.
70. Karaszkievicz, J. W. (2005). *Critical Factors in Immunoassay Optimization*. KPL, Inc. <https://www.seracare.com/globalassets/seracare-resources/an-critical-factors-in-immunoassay-optimization.pdf>.
71. Keeler, C. L., Jr, Hazel, J. W., Hastings, J. E., & Rosenberger, J. K. (1993). Restriction endonuclease analysis of Delmarva field isolates of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Diseases*, 37(2), 418–426. <https://doi.org/10.2307/1591668>.
72. Kelly, B. J., Fraefel, C., Cunningham, A. L., & Diefenbach, R. J. (2009). Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Research*, 145(2), 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.07.007>.
73. Kingsley, D. H., & Keeler, C. L., Jr (1999). Infectious laryngotracheitis virus, an alpha herpesvirus that does not interact with cell surface heparan sulfate. *Virology*, 256(2), 213–219. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9609>.
74. Kingsley, D. H., Hazel, J. W., & Keeler, C. L., Jr (1994). Identification and characterization of the infectious laryngotracheitis virus glycoprotein C gene. *Virology*, 203(2), 336–343. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1492>.
75. Kirkpatrick, N. C., Mahmoudian, A., Colson, C. A., Devlin, J. M., & Noormohammadi, A. H. (2006). Relationship between mortality, clinical signs and tracheal pathology in infectious laryngotracheitis. *Avian Pathology*, 35(6), 449–453. <https://doi.org/10.1080/03079450601028803>.
76. Kotiw, M., Wilks, C. R., & May, J. T. (1995). The effect of serial in vivo passage on the expression of virulence and DNA stability of an infectious laryngotracheitis virus strain of low virulence. *Veterinary Microbiology*, 45(1), 71–80. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)00115-d](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)00115-d).
77. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing

platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

78. Kumar, V., Yadav, K., Kumar, R., Chaudhary, N., & Kumar, S. (2019). Glycoprotein D peptide-based diagnostic approach for the detection of avian infectious laryngotracheitis antibodies. *Avian Pathology*, 48(6), 602–609. <https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1631444>.

79. La, T. M., Choi, E. J., Lee, J. B., Park, S. Y., Song, C. S., Choi, I. S., & Lee, S. W. (2019). Comparative genome analysis of Korean field strains of infectious laryngotracheitis virus. *PloS One*, 14(2), e0211158. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211158>.

80. Lee, S. W., Markham, P. F., Markham, J. F., Petermann, I., Noormohammadi, A. H., Browning, G. F., Ficorilli, N. P., Hartley, C. A., & Devlin, J. M. (2011). First complete genome sequence of infectious laryngotracheitis virus. *BMC Genomics*, 12, 197. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-197>.

81. Leib, D. A., Bradbury, J. M., Gaskell, R. M., Hughes, C. S., & Jones, R. C. (1986). Restriction endonuclease patterns of some European and American isolates of avian infectious laryngotracheitis virus. *Avian Diseases*, 30(4), 835–837. <https://doi.org/10.2307/1590595>.

82. Linares, J. A., Bickford, A. A., Cooper, G. L., Charlton, B. R., & Woolcock, P. R. (1994). An outbreak of infectious laryngotracheitis in California broilers. *Avian Diseases*, 38(1), 188–192. <https://doi.org/10.2307/1591856>.

83. Loncoman, C. A., Hartley, C. A., Coppo, M. J., Vaz, P. K., Diaz-Méndez, A., Browning, G. F., Lee, S. W., & Devlin, J. M. (2017). Development and application of a TaqMan single nucleotide polymorphism genotyping assay to study infectious laryngotracheitis virus recombination in the natural host. *PloS One*, 12(3), e0174590. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174590>.

84. Magouz, A., Medhat, S., Abou Asa, S., & Desouky, A. (2018). Detection of infectious laryngotracheitis virus (Gallid herpesvirus-1) from

clinically infected chickens in Egypt by different diagnostic methods. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 19(3), 194–201. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2018.4938>.

85. 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 Pathology*, 40(3), 237–242. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.553582>.

86. Marek, A., Günes, A., Schulz, E., & Hess, M. (2010). Classification of fowl adenoviruses by use of phylogenetic analysis and high-resolution melting-curve analysis of the hexon L1 gene region. *Journal of Virological Methods*, 170(1–2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.09.019>.

87. McGeoch, D. J., Dalrymple, M. A., Davison, A. J., Dolan, A., Frame, M. C., McNab, D., Perry, L. J., Scott, J. E., & Taylor, P. (1988). The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *The Journal of General Virology*, 69(7), 1531–1574. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-7-1531>.

88. McGeoch, D. J., Dolan, A., & Ralph, A. C. (2000). Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *Journal of Virology*, 74(22), 10401–10406. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.22.10401-10406.2000>.

89. McGeoch, D. J., Rixon, F. J., & Davison, A. J. (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Research*, 117(1), 90–104. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.002>

90. McMullin, P. (2004). *A Pocket Guide to Poultry Health and Disease*. 5M Enterprises Ltd.

91. McNulty, M., Allan, G., & McCracken, R. (1985). Infectious laryngotracheitis in Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 39(8), 124–125.

92. Menendez, K. R., García, M., Spatz, S., & Tablante, N. L. (2014). Molecular epidemiology of infectious laryngotracheitis: a review. *Avian Pathology*, 43(2), 108–117. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.886004>.
93. Mettenleiter T. C. (2002). Herpesvirus assembly and egress. *Journal of Virology*, 76(4), 1537–1547. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.4.1537-1547.2002>.
94. Molini, U., Aikukutu, G., Khaiseb, S., Kahler, B., Van der Westhuizen, J., Cattoli, G., & Dundon, W. G. (2019). Investigation of infectious laryngotracheitis outbreaks in Namibia in 2018. *Tropical Animal Health and Production*, 51(7), 2105–2108. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01918-x>.
95. Morales Ruiz, S., Bendezu Eguis, J., Montesinos, R., Tataje-Lavanda, L., & Fernández-Díaz, M. (2018). Full-genome sequence of infectious laryngotracheitis virus (gallid alphaherpesvirus 1) strain VFAR-043, isolated in Peru. *Genome Announcements*, 6(10), e00078-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00078-18>.
96. Nakamichi, K., Matsumoto, Y., & Otsuka, H. (2002). Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is necessary for maintaining cell-to-cell junctional adherence among infected cells. *Virology*, 294(1), 22–30. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1264>.
97. Neff, C., Sudler, C., & Hoop, R. K. (2008). Characterization of western European field isolates and vaccine strains of avian infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism and sequence analysis. *Avian Diseases*, 52(2), 278–283. <https://doi.org/10.1637/8168-110107-Reg.1>.
98. Nielsen, O. L., Handberg, K. J., & Jørgensen, P. H. (1998). In situ hybridization for the detection of infectious laryngotracheitis virus in sections of trachea from experimentally infected chickens. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 39(4), 415–421. <https://doi.org/10.1186/BF03547767>.
99. Noll, S., & Schaub-Kuhnen, S. (2000). *Praxis der Immunhistochemie*. Urban und Fischer Verlag.
100. Norberg, P., Depledge, D. P., Kundu, S., Atkinson, C., Brown, J., Haque, T., Hussaini, Y., MacMahon, E., Molyneaux, P., Papaevangelou, V.,

Sengupta, N., Koay, E. S., Tang, J. W., Underhill, G. S., Grahn, A., Studahl, M., Breuer, J., & Bergström, T. (2015). Recombination of globally circulating Varicella-Zoster virus. *Journal of Virology*, 89(14), 7133–7146. <https://doi.org/10.1128/JVI.00437-15>.

101. Odisho, S. M., Allawe, A. B., & Barhoom, S. (2015). Investigation of infectious laryngeotracheitis virus in Iraqi chicken farms. *Basrah Journal of Veterinary Research*, 14(1), 302-310. https://bjvr.uobasrah.edu.iq/article_102447.html.

102. OIE (Office International des Épizooties). (2008). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Mammals, Birds and Bees* (6th ed.). OIE.

103. OIE Disease Information. (2014, 1/25/2014). <https://www.oie.int>.

104. Ojkic, D., Swinton, J., Vallieres, M., Martin, E., Shapiro, J., Sanei, B., & Binnington, B. (2006). Characterization of field isolates of infectious laryngotracheitis virus from Ontario. *Avian Pathology*, 35(4), 286–292. <https://doi.org/10.1080/03079450600815481>.

105. Oldoni, I., & García, M. (2007). Characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates from the US by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of multiple genome regions. *Avian Pathology*, 36(2), 167–176. <https://doi.org/10.1080/03079450701216654>.

106. Oldoni, I., Rodríguez-Avila, A., Riblet, S. M., Zavala, G., & García, M. (2009). Pathogenicity and growth characteristics of selected infectious laryngotracheitis virus strains from the United States. *Avian Pathology*, 38(1), 47–53. <https://doi.org/10.1080/03079450802632031>.

107. Ou, S. C., & Giambrone, J. J. (2012). Infectious laryngotracheitis virus in chickens. *World Journal of Virology*, 1(5), 142–149. <https://doi.org/10.5501/wjv.v1.i5.142>.

108. Ou, S., Giambrone, J. J., & Macklin, K. S. (2011). Infectious laryngotracheitis vaccine virus detection in water lines and effectiveness of

sanitizers for inactivating the virus. *Journal of Applied Poultry Research*, 20(2), 223–230. <https://doi.org/10.3382/japr.2010-00300>.

109. Ou, S.-C., Giambrone, J. J., & Macklin, K. S. (2012). Detection of infectious laryngotracheitis virus from darkling beetles and their immature stage (lesser mealworms) by quantitative polymerase chain reaction and virus isolation. *Journal of Applied Poultry Research*, 21(1), 33–38. <https://doi.org/10.3382/japr.2010-00314>.

110. Parra, S. H., Nuñez, L. F., Astolfi-Ferreira, C. S., & Ferreira, A. J. (2015). Persistence of the tissue culture origin vaccine for infectious laryngotracheitis virus in commercial chicken flocks in Brazil. *Poultry Science*, 94(11), 2608–2615. <https://doi.org/10.3382/ps/pev213>.

111. Piccirillo, A., Lavezzo, E., Niero, G., Moreno, A., Massi, P., Franchin, E., Toppo, S., Salata, C., & Palù, G. (2016). Full genome sequence-based comparative study of wild-type and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus from Italy. *PloS One*, 11(2), e0149529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149529>.

112. Preis, I. S., Braga, J. F. V., Couto, R. M., Brasil, B. S. A. F., Martins, N. R. S., & Ecco, R. (2013). Outbreak of infectious laryngotracheitis in large multi-age egg layer chicken flocks in Minas Gerais, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(5), 591–596. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2013000500007>.

113. Prideaux, C. T., Kongsuwan, K., Johnson, M. A., Sheppard, M., & Fahey, K. J. (1992). Infectious laryngotracheitis virus growth, DNA replication, and protein synthesis. *Archives of Virology*, 123(1–2), 181–192. <https://doi.org/10.1007/BF01317148>.

114. Purcell, D. A., & McFerran, J. B. (1969). Influence of method of infection on the pathogenesis of infectious laryngotracheitis. *Journal of Comparative Pathology*, 79(3), 285–291. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(69\)90041-3](https://doi.org/10.1016/0021-9975(69)90041-3).

115. Reddy, V. R., Steukers, L., Li, Y., Fuchs, W., Vanderplasschen, A., & Nauwynck, H. J. (2014). Replication characteristics of infectious

laryngotracheitis virus in the respiratory and conjunctival mucosa. *Avian Pathology*, 43(5), 450–457. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.956285>.

116. Roba, Y. T., Tadesse, D., Assefa, Z., & Tesfaye, A. (2020). Seroprevalence of infectious laryngotracheitis disease in backyard chickens in villages of Ada'a district, Oromia, Ethiopia: first report. *Tropical Animal Health and Production*, 52(6), 3109–3112. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02334-2>.

117. Robertson, G. M., & Egerton, J. R. (1981). Replication of infectious laryngotracheitis virus in chickens following vaccination. *Australian Veterinary Journal*, 57(3), 119–123. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1981.tb00472.x>.

118. Roizman, B., & Pellett, Ph. E. (2001). The family Herpesviridae: A brief introduction. In D. M. Knipe & P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology* (4th ed., pp. 2381–2397). Lippincott Williams & Wilkins.

119. Roy, P., Fakhrul Islam, A. F. M., Burgess, S. K., Hunt, P. W., McNally, J., & Walkden-Brown, S. W. (2015). Real-time PCR quantification of infectious laryngotracheitis virus in chicken tissues, faeces, isolator-dust and bedding material over 28 days following infection reveals high levels in faeces and dust. *The Journal of General Virology*, 96(11), 3338–3347. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000268>.

120. Ruano, M., El-Attrache, J., & Villegas, P. (2001). Efficacy comparisons of disinfectants used by the commercial poultry industry. *Avian Diseases*, 45(4), 972–977. <https://doi.org/10.2307/1592876>.

121. Russell R. G. (1983). Respiratory tract lesions from infectious laryngotracheitis virus of low virulence. *Veterinary Pathology*, 20(3), 360–369. <https://doi.org/10.1177/030098588302000312>.

122. Russell, R. G., & Turner, A. J. (1983). Characterization of infectious laryngotracheitis viruses, antigenic comparison by kinetics of neutralization and immunization studies. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 47(2), 163–171. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/6192888>.

123. Sabir, A. J., Olaogun, O. M., O'Rourke, D., Fakhri, O., Coppo, M. J. C., Devlin, J. M., Konsak-Ilievski, B., & Noormohammadi, A. H. (2020). Full

genomic characterisation of an emerging infectious laryngotracheitis virus class 7b from Australia linked to a vaccine strain revealed its identity. *Infection, Genetics and Evolution*, 78, 104067. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104067>.

124. Saif, Y. M., Barnes, H. J., Glisson, J. R., Fadly, A. M., McDougald, L. R., & Swayne, D. E. (Eds.) (2003). *Diseases of Poultry* (11th ed). Iowa State University Press.

125. Saif, Y. M., Fadly, A. M., Glisson, J. R., McDougald, L. R., Nolan, L. K., & Swayne, D. E. (Eds.) (2008). *Diseases of Poultry* (12th ed). Blackwell Publishing.

126. Santander Parra, S., Nunez, L., Buim, M. R., Astolfi-Ferreira, C. S., & Piantino Ferreira, A. J. (2018). Development of a qPCR for the detection of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) based on the gE gene. *British Poultry Science*, 59(4), 402–407. <https://doi.org/10.1080/00071668.2018.1479060>.

127. Sary, K., Chénier, S., Gagnon, C. A., Shivaprasad, H. L., Sylvestre, D., & Boulianne, M. (2017). Esophagitis and Pharyngitis Associated with Avian Infectious Laryngotracheitis in Backyard Chickens: Two Cases. *Avian Diseases*, 61(2), 255–260. <https://doi.org/10.1637/11523-103016-Case.1>.

128. Schnitzlein, W. M., Winans, R., Ellsworth, S., & Tripathy, D. N. (1995). Generation of thymidine kinase-deficient mutants of infectious laryngotracheitis virus. *Virology*, 209(2), 304–314. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1262>.

129. Shahsavandi, S., Jamshidi-Navroud, Z., Firouzi, M., & Ebrahimi, M. M. (2017). Examining responses of chicken embryonic neural stem cell to infectious laryngotracheitis virus infections. *Comparative Clinical Pathology*, 26(2), 493–498. <https://doi.org/10.1007/s00580-017-2405-7>

130. Spatz, S. J., Garcia, M., Riblet, S., Ross, T. A., Volkening, J. D., Taylor, T. L., Kim, T., & Afonso, C. L. (2019). MinION sequencing to genotype US strains of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathology*, 48(3), 255–269. <https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1579298>.

131. Srinivasan, P., Balachandran, C., Murthy, T., Saravanan, S., Pazhanivel, N., Mohan, B., & Manohar, B. M. (2012). Pathology of infectious laryngotracheitis in commercial layer chicken. *The Indian Veterinary Journal*, 89(8), 75–78.
132. Steukers, L., Vandekerckhove, A. P., Van den Broeck, W., Glorieux, S., & Nauwynck, H. J. (2012). Kinetics of BoHV-1 dissemination in an in vitro culture of bovine upper respiratory tract mucosa explants. *ILAR Journal*, 53(1), E43–E54. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.1.43>.
133. Thilakarathne, D. S., Hartley, C. A., Diaz-Méndez, A., Coppo, M. J. C., & Devlin, J. M. (2020). Development and application of a combined molecular and tissue culture-based approach to detect latent infectious laryngotracheitis virus (ILTV) in chickens. *Journal of Virological Methods*, 277, 113797. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113797>.
134. Timurkaan, N., Yilmaz, F., Bulut, H., Ozer, H., & Bolat, Y. (2003). Pathological and immunohistochemical findings in broilers inoculated with a low virulent strain of infectious laryngotracheitis virus. *Journal of Veterinary Science*, 4(2), 175–180. <https://doi.org/10.4142/jvs.2003.4.2.175>.
135. Tran, L. C., Kissner, J. M., Westerman, L. E., & Sears, A. E. (2000). A herpes simplex virus 1 recombinant lacking the glycoprotein G coding sequences is defective in entry through apical surfaces of polarized epithelial cells in culture and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), 1818–1822. <https://doi.org/10.1073/pnas.020510297>.
136. Trus, B. L., Cheng, N., Newcomb, W. W., Homa, F. L., Brown, J. C., & Steven, A. C. (2004). Structure and polymorphism of the UL6 portal protein of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology*, 78(22), 12668–12671. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.22.12668-12671.2004>.
137. Tully, T. N. (1995). Avian respiratory diseases: Clinical overview. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 9(3), 162–174. <https://www.jstor.org/stable/30134458>.

138. UNECE (United Nations Economic Commission for Europe). (2003). *Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Model Regulations* (13th ed.). <https://doi.org/10.18356/8fb733fd-en>.

139. Usova, L., Veretsun, A., & Muzyka, D. (2019). Infectious laryngotracheitis in Ukraine in 2010–2018: Epizootological monitoring and study of biological properties of field isolates. *4th Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium (Kyiv, Ukraine, 20–24 May 2019)* : abstr. (p. 239).

140. Vanderkop M. A. (1993). Alberta. Infectious laryngotracheitis in commercial broiler chickens. *The Canadian veterinary journal*, 34(3), 185. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/pmid/17424192>.

141. Veretsun, A., Stegnyy, B., Rula, O., Bolotin, V., Stegnyy, A., Gerilovych, A., & Muzyka, D. (2021a). Molecular and genetic characterization of avian laryngotracheitis virus isolates obtained in Ukraine. *Agricultural Science and Practice*, 8(1), 37–46. <https://doi.org/10.15407/agrisp8.01.032>.

142. Veretsun, A., Stegnyy, B., Usova, L., Rula, O., & Muzyka, D. (2021b). The experimental infection of vaccine-like isolates of Infectious laryngotracheitis virus isolated in Ukraine in 2010–2012. *Veterinarija ir Zootechnika*, 79(2), 25–31. <https://vetzoo.lsmuni.lt/data/vols/2021/7902/pdf/veretsun.pdf>.

143. Vöggtlin, A., Bruckner, L., & Ottiger, H. P. (1999). Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of vaccine contamination by infectious laryngotracheitis virus. *Vaccine*, 17(20–21), 2501–2506. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(99\)00068-7](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00068-7).

144. Wang, L. G., Ma, J., Xue, C. Y., Wang, W., Guo, C., Chen, F., Qin, J. P., Huang, N. H., Bi, Y. Z., & Cao, Y. C. (2013). Dynamic distribution and tissue tropism of infectious laryngotracheitis virus in experimentally infected chickens. *Archives of Virology*, 158(3), 659–666. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1414-8>.

145. Wild, M. A., Cook, S., & Cochran, M. (1996). A genomic map of infectious laryngotracheitis virus and the sequence and organization of genes

present in the unique short and flanking regions. *Virus genes*, 12(2), 107–116. <https://doi.org/10.1007/BF00572949>.

146. Wilks, C. R., & Kogan, V. G. (1979). An immunofluorescence diagnostic test for avian infectious laryngotracheitis. *Australian Veterinary Journal*, 55(8), 385–388. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1979.tb15864.x>.

147. Williams, R. A., Bennett, M., Bradbury, J. M., Gaskell, R. M., Jones, R. C., & Jordan, F. T. (1992). Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction. *The Journal of General Virology*, 73(9), 2415–2420. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-9-2415>.

148. Yamada, S., Matsuo, K., Fukuda, T., & Uchinuno, Y. (1980). Susceptibility of ducks to the virus of infectious laryngotracheitis. *Avian Diseases*, 24(4), 930–938. <https://doi.org/10.2307/1589968>.

149. York, J. J., & Fahey, K. J. (1990). Humoral and cell-mediated immune responses to the glycoproteins of infectious laryngotracheitis herpesvirus. *Archives of Virology*, 115(3–4), 289–297. <https://doi.org/10.1007/BF01310537>.

150. Zavala, G. (2011). The old and new landscapes of infectious laryngotracheitis. *The Poultry Informed Professional*, 118, 1–7.

151. Zhao, Y., Kong, C., Cui, X., Cui, H., Shi, X., Zhang, X., Hu, S., Hao, L., & Wang, Y. (2013). Detection of infectious laryngotracheitis virus by real-time PCR in naturally and experimentally infected chickens. *PloS One*, 8(6), e67598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067598>.

152. Zhuang, Q. Y., Wang, S. C., Li, J. P., Liu, D., Liu, S., Jiang, W. M., & Chen, J. M. (2014). A clinical survey of common avian infectious diseases in China. *Avian Diseases*, 58(2), 297–302. <https://doi.org/10.1637/10709-110113-ResNote.1>.

153. Zierenberg, K., Nieper, H., van den Berg, T. P., Ezeokoli, C. D., Voss, M., & Müller, H. (2000). The VP2 variable region of African and German isolates of infectious bursal disease virus: comparison with very virulent,

"classical" virulent, and attenuated tissue culture-adapted strains. *Archives of Virology*, 145(1), 113–125. <https://doi.org/10.1007/s007050050009>.

154. Бабкін, В., Макогон, В., & Герман, В. (1997). Вакцинопрофілактика інфекційного ларинготрахеїту та ньюкаслської хвороби птиці в умовах півдня України. *Ветеринарна медицина України*, (12), 20–22.

155. Верещун, А. Л., & Усова, Л. П. (2021). Очистка та концентрування антигену для ІФА з використанням епізоотичних ізолятів вірусу інфекційного ларинготрахеїту, виділених в Україні. *Ветеринарна медицина*, 107, 65–70. <https://doi.org/10.36016/VM-2021-107-11>.

156. Верещун, А. Л., Рула, О. М., Усова, Л. П., & Музика, Д. В. (2021). Циркуляція вірусу інфекційного ларинготрахеїту у птахівничих господарствах України у 2009–2020 роках. *Ветеринарна біотехнологія*, 38, 21–35. https://doi.org/10.31073/vet_biotech38-02.

157. Верещун, А. Л., Усова, Л. П., & Музика, Д. В. (2024). Вітчизняна тест-система для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом. *Тези доповідей онлайн-конференції аспірантів і молодих вчених у сфері Єдиного здоров'я та біотехнології «VetBioConnect», м. Харків, 3–4 червня 2024 року* (с. 51–53). https://www.iekvm.kharkov.ua/documents/VetBioConnect_2024_theses.pdf.

158. Верещун, А., & Музика, Д. (2021). Серологічний моніторинг інфекційного ларинготрахеїту в Україні. *Матеріали III щорічної міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні епідемічні виклики в концепції «Єдине здоров'я», м. Тернопіль, 18–19 травня 2021 року* (с. 16). <http://ivm.kiev.ua/wp-content/uploads/ПРОГРАМА-повна-2021.pdf>.

159. Воротілова, Н. Г. (2014). *Епізоотологічний моніторинг високопатогенного грипу, інфекційного ларинготрахеїту птиці та біологічні властивості збудників* [дис. ... канд. вет. наук, Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної

медицини»]. Національний репозитарій академічних текстів.
<https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0414U003357>.

160. Держспоживстандарт України. (2006). *Препарати ветеринарні імунобіологічні. Метод виявлення контамінації бактеріальною та грибовою мікрофлорою* (ДСТУ 4483:2005). Держспоживстандарт України.

161. Івлева, О. В. (2019). *Асоційований перебіг метаневмовірусної інфекції птиці та удосконалення її лабораторної діагностики*. [дис. ... канд. вет. наук, Луганський національний аграрний університет]. Національний репозитарій академічних текстів. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0420U100065>.

162. Музика, Н. М. (2011). Тест-система для виявлення антитіл до вірусу ентериту гусей методом ІФА. *Ветеринарна медицина*, 95, 173–174.
http://nbuv.gov.ua/UJRN/vetmed_2011_95_75.

163. Музика, Д. В., Верецун, А. Л., Стегній, А. Б., Рула, О. М., & Усова, Л. П. (2018). Виділення та ідентифікація епізоотичного ізоляту вірусу інфекційного ларинготрахеїту. *Ветеринарна медицина*, 104, 137–142.
https://jvm.kharkov.ua/sbornik/104/VetMed_104.pdf.

164. *Офіційний сайт Асоціації «Союз птахівників України»*. (2014, 1/22/2014). <https://www.ptaha.kiev.ua>

165. Стегній, Б. Т., & Воротілова, Н. Г. (2012). Спалах інфекційного ларинготрахеїту серед курей-несучок промислового утримання. *Ветеринарна медицина*, 96, 234–237. http://nbuv.gov.ua/UJRN/vetmed_2012_96_94.

166. Стегній, Б. Т., & Воротілова, Н. Г. (2013). Вивчення біологічних властивостей ізоляту вірусу інфекційного ларинготрахеїту курей, виділеного на території АР Крим. *Ветеринарна медицина*, 97, 128–131.
http://nbuv.gov.ua/UJRN/vetmed_2013_97_56.

167. Стегній, Б. Т., Заремба, І. А., & Усова, Л. П. (2013a). Розробка антигену для діагностики респіраторного мікоплазмозу птиці методом

імуноферментного аналізу. *Ветеринарна медицина*, 97, 545–547.
http://nbuv.gov.ua/UJRN/vetmed_2013_97_228.

168. Стегній, Б. Т., Музика, Д. В., Рула, О. М., Стегній, А. Б., Ткаченко, С. В., Майорова, К. Ф., Усова, Л. П., Полторацький, Є. В., & Воротілова Н. Г. (2013b). Моніторинг інфекційного ларинготрахеїту в Україні та світі. *Ветеринарна медицина*, 97, 237–239. http://nbuv.gov.ua/UJRN/vetmed_2013_97_96.

169. Стегній, Б. Т., Музика, Д. В., Стегній, А. Б., Воротілова, Н. Г., Трофімов, М. М., & Іонкіна, І. Б. (2013c). Епізоотологічний моніторинг вірусних хвороб птиці на території АР Крим. *Ветеринарна медицина*, 97, 233–236. http://nbuv.gov.ua/UJRN/vetmed_2013_97_95.

170. Усова, Л. П. (2016). *Епізоотологічний моніторинг та вдосконалення лабораторної діагностики інфекційного бронхіту у курей* [дис. ... канд. вет. наук, Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»]. Національний репозитарій академічних текстів. <https://nrat.ukrintei.ua/searchdoc/0416U005786>.

171. Усова, Л. П., Музика, Д. В., Стегній, Б. Т., Верецун, А. Л., & Рула, О. М. (2021). *Тест-система для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом* (Патент на корисну модель UA 147074). Національний орган інтелектуальної власності Державне підприємство «Український інститут інтелектуальної власності». <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1587091>.

ДОДАТОК А
НОМЕР ДОСТУПУ MZ333273
В БАЗІ ДАНИХ GENBANK

An official website of the United States government [Here's how you know](#)

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Log in

Nucleotide

Advanced Help

GenBank Send to:

Analyze this sequence

[Run BLAST](#)

[Pick Primers](#)

[Highlight Sequence Features](#)

[Find in this Sequence](#)

Related information

[Protein](#)

[Taxonomy](#)

Recent activity

[Turn Off](#) [Clear](#)

[Gallid alphaherpesvirus 1 strain B2-10 envelope glycoprotein E \(US8\) gene](#) Nucleotide

[Gallid alphaherpesvirus 1 strain B59-11 envelope glycoprotein E \(US8\) gene](#) Nucleotide

[Human parainfluenza virus 4a isolate HPiV-4/human/USA/MA-Broad_BWH-2271](#) Nucleotide

[Human parainfluenza virus 4b strain 2019_0337, partial genome](#) Nucleotide

[Human orthorubulavirus 4 strain HPiV4B/USA/AN34CD/2022, complete genome](#) Nucleotide

[See more...](#)

Gallid alphaherpesvirus 1 strain B2-10 envelope glycoprotein E (US8) gene, partial cds

GenBank: MZ333273.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS MZ333273 405 bp DNA linear VRL 09-OCT-2021

DEFINITION Gallid alphaherpesvirus 1 strain B2-10 envelope glycoprotein E (US8) gene, partial cds.

ACCESSION MZ333273

VERSION MZ333273.1

KEYWORDS .

SOURCE Gallid alphaherpesvirus 1 (Infectious laryngotracheitis virus)

ORGANISM [Gallid alphaherpesvirus 1](#)
Viruses; Duplodnaviria; Heunggongvirae; Pevloviricota; Herpesvirales; Orthoherpesviridae; Alphaherpesvirinae; Iltovirus; Iltovirus gallidalphal1.

REFERENCE 1 (bases 1 to 405)

AUTHORS Veretsun,A.L., Stegny,B.T., Rula,O.M., Bolotin,V.I., Stegny,A.B., Gerilovych,A.P. and Muzyka,D.V.

TITLE Molecular and genetic characterization of avian laryngotracheitis virus isolates obtained in east Ukraine

JOURNAL Agric Sci Pract 8 (1), 37-46 (2021)

REFERENCE 2 (bases 1 to 405)

AUTHORS Muzyka,D., Rula,O. and Veretsun,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (02-JUN-2021) Head of Laboratory of Avian Viral Diseases, National Scientific Center Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Pushkinska St. 83, Kharkiv, Kharkiv Region 61023, Ukraine

COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES
source
Location/Qualifiers
1..405
/organism="Gallid alphaherpesvirus 1"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="B2-10"
/host="chicken"
/db_xref="taxon:10386"
/geo_loc_name="Ukraine"
/collection_date="2010"

gene
1..405
/gene="US8"
1..405
/gene="US8"
/codon_start=3
/product="envelope glycoprotein E"
/protein_id="US82271.1"
/translation="VYHPTDGKQFPATNQRLIGSVLMAEFLGAASLLDCSRDTLED
CHENRVPNLRFDSRLSESRAGLVISPLIAPKVLIIIVSDGILGWSYTVLGRNSPR
VVVETHMPKVPMMKVVIGSPGMDETGNYKM"

ORIGIN
1 tcgtatacca tcttacagac ggcaaatgac agtttccgcg aaccaaccag agatgcctca
61 taggatctgt cttgatggcg gaattcttgg gcgcggcctc ttgtctgagt tgttcccgcg
121 atactctaga agactgccac gaaatcgcgc tgccgaacct acggttcgat tcgcgactct
181 ccgagtcacg cgcaggcctg gtgatcagtc ctcttatagc catcccaaaa gttttgatta
241 tagctgtttc cgacggagac attttgggat ggagctacac ggtgctcggg aaacgtaaca
301 gtcgcgcgct agtagtcgaa acgcacatgc cctcgaaggt cccgatgaac aaagtagtaa
361 ttggcagtcg cggaccaatg gacgaaacgc gtaactataa aatgt
//

FOLLOW NCBI

[X](#) [f](#) [in](#) [RSS](#)

Connect with NLM

National Library of Medicine
8600 Rockville Pike
Bethesda, MD 20894

Web Policies
FOIA
HHS Vulnerability Disclosure

Help
Accessibility
Careers

NLM | NIH | HHS | USA.gov

An official website of the United States government
[Here's how you know](#)

National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Log in

Nucleotide

Advanced

GenBank

Send to:

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Related information

Protein

Taxonomy

Recent activity

Turn Off
Clear

Gallid alphaherpesvirus 1 strain B59-11 envelope glycoprotein E (USB) gene
Nucleotide

Human parainfluenza virus 4a isolate HPIV-4/human/USA/MA-Broad_BWH-2271
Nucleotide

Human parainfluenza virus 4b strain 2019_0337, partial genome
Nucleotide

Human orthorubulavirus 4 strain HPIV4B/USA/AN34CD/2022, complt
Nucleotide

Bat paramyxovirus isolate BtCov-Zim026Mag RNA-dependent RNA-
Nucleotide

See more...

Gallid alphaherpesvirus 1 strain B59-11 envelope glycoprotein E (USB) gene, partial cds

GenBank: MZ323228.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: ☐

LOCUS	MZ323228	479 bp	DNA	Linear	VRL 09-OCT-2021
DEFINITION	Gallid alphaherpesvirus 1 strain B59-11 envelope glycoprotein E (USB) gene, partial cds.				
ACCESSION VERSION	MZ323228				
KEYWORDS	MZ323228.1				
SOURCE ORGANISM	Gallid alphaherpesvirus 1 (Infectious laryngotracheitis virus) Gallid alphaherpesvirus 1				
REFERENCE AUTHORS	Veretsun,A.L., Stegny,B.T., Rula,O.M., Bolotin,V.I., Stegny,A.B., Gerilovych,A.P. and Muzyka,D.V.				
TITLE	Molecular and genetic characterization of avian laryngotracheitis virus isolates obtained in east Ukraine				
JOURNAL REFERENCE	Agric Sci Pract 8 (1), 37-46 (2021)				
AUTHORS	Muzyka,D., Rula,O. and Veretsun,A.				
JOURNAL	Submitted (28-MAY-2021) Head of Laboratory of Avian Viral Diseases, National Scientific Center Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Pushkinska St. 83, Kharkiv, Kharkiv Region 61023, Ukraine				
COMMENT	##Assembly-Data-START## Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing ##Assembly-Data-END##				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..479 /organism="Gallid alphaherpesvirus 1" /mol_type="genomic DNA" /strain="B59-11" /isolate="17ILTF" /host="chicken" /db_xref="taxon:10386" /geo_loc_name="Ukraine" /collection_date="2011" <1..>479 /gene="USB" <1..>479 /gene="USB" /codon_start=1 /product="envelope glycoprotein E" /protein_id="UBW82270.1" /translation="TKIYLIGSVLMAEFLGAASLLDCSRDTECHENRVNPLRFDSRLSESRAGLVISPLIAIPKVLIIIVSDGILGWSYTLVGRNSPRVVXTHMPSKVPMNKKVIGSPGPMDETGNKYMFVAVGTATCIVLTALLVGKKKCPAHQMGTFKSKEPL"				
ORIGIN	1 acccaaratat accctcatagg atctgtcttg atggcggaaat tcttgggcgc ggcctctttg 61 ctggattgtt ccgcgatac tctagaagac tgccacgaaa atcgcgtgcc gaacctacgg 121 ttcgattcgc gactctcga gtcacgcga gccctgggta tcagctctct tatagcctc 181 cccaagtgtt gtattatagt cgtttccgac ggagacattt tgggatggag ctacacggg 241 ctccgggaac gtaacgtcc gcgcgtagta gtcraacgc acatgccctc gaagtcgcc 301 atgaacaag tagtaattg cagtcgccga ccaatggagc aaacggtaaa ctataaaatg 361 tacttctctg tcgcgggggt gaccgcgacg tgcgtaatc ttacatgcgc tctgcttg 421 gggaaaaaga agtgcgccgc gcaccaaatg ggtactttt ccaagaccga accattgtg				
//					

FOLLOW NCBI

Connect with NLM

National Library of Medicine
8600 Rockville Pike
Bethesda, MD 20894

Web Policies
FOIA
HHS Vulnerability Disclosure

Help
Accessibility
Careers

NLM | NIH | HHS | USA.gov

ДОДАТОК В





УКРАЇНА

(19) UA

(11) 147074

(13) U

(51) МПК

A61K 39/12 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2020 07468

(22) Дата подання заявки: 23.11.2020

(24) Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: 08.04.2021(46) Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: 07.04.2021, Бюл. № 14

(72) Винахідник(и):

Усова Лариса Петрівна (UA),
Музика Денис Васильович (UA),
Стегній Борис Тимофійович (UA),
Верецун Андрій Леонідович (UA),
Рула Олександр Миколайович (UA)

(73) Володілець (володільці):

НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
"ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І
КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ",
вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)

(54) ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ДО ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО ЛАРИНГОТРАХЕЇТУ ІМУНОФЕРМЕНТНИМ МЕТОДОМ

(57) Реферат:

Тест-система для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом містить антиген вірусу ІЛТ, позитивну контрольну сироватку крові курей з антитілами до вірусу інфекційного ларинготрахеїту, негативну контрольну сироватку крові курей, імунопероксидазний кон'югат проти Ig курей, буфер для розведення дослідних і контрольних зразків імунопероксидазного кон'югату, субстрат, стоп-реагент. Як антиген містить штам "В 59-11", а як субстратно-індикаторну суміш використано однокомпонентний субстрат - тетраметилбензидин (ТМБ).

UA 147074 U

Корисна модель належить до ветеринарної вірусології, діагностики та біотехнології і може використовуватись при виробництві тест-системи для серологічної діагностики інфекційного ларинготрахеїту курей в імуноферментному аналізі.

Серологічний моніторинг з використанням тест-систем ІФА є обов'язковим елементом в системі контролю ІЛТ. Для підтримки високої специфічності діагностиків необхідно постійно удосконалювати технологічний регламент їх виготовлення та контролювання, а, головне, оновлювати виробничі штами за рахунок використання актуальних епізоотичних штамів, які циркулюють на відповідній території.

Відомі набори для проведення ІФА фірм, що спеціалізуються на виробництві засобів молекулярно-біологічної діагностики, що виявляють антитіла до вірусу ІЛТ: IDEXX (США), KPL (США), Biochek (Нідерланди) [Development of a sensitive and specific xMAP assay for detection of antibodies against infectious laryngotracheitis and bronchitis viruses / Wang et al. - Virology Journal, 2018-Vol. 15-P. 146]. Недоліком цих тест-систем є їх висока вартість.

Існує "Спосіб імуноферментного визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту птиці" (Патент Україна № 30089 11.02.2008. Бюл. № 3 2008). В ньому використовуються: антиген вірусу ІЛТ штаму "L-99", позитивна та негативна контрольні сироватки крові курей, імунопероксидазний кон'югат проти Ig G курей, субстрат ортофенілєндіамін (ОФД), стоп-реагент. Це рішення може бути прототипом. Недоліком є складність виготовлення діагностичного та використання як антигену вірусу ІЛТ штаму "L-99".

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити тест-систему для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом, що містить антиген вірусу ІЛТ, позитивну контрольну сироватку крові курей, негативну контрольну сироватку, імунопероксидазний кон'югат проти Ig G курей, буфер для розведення дослідних і контрольних зразків імунопероксидазного кон'югату, субстрат, стоп-реагент шляхом використання як антигену штаму "B 59-11", як субстратно-індикаторної суміші однокомпонентний субстрат - тетраметилбензидин (ТМБ), щоб забезпечити ефективність тест-системи.

Поставлена задача вирішується тим, що тест-система для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом містить антиген вірусу ІЛТ, позитивну контрольну сироватку крові курей з антитілами до вірусу інфекційного ларинготрахеїту, негативну контрольну сироватку крові курей, імунопероксидазний кон'югат проти Ig G курей, буфер для розведення дослідних і контрольних зразків імунопероксидазного кон'югату, субстрат, стоп-реагент, згідно з корисною моделлю, як антиген містить штам "B 59-11", а як субстратно-індикаторну суміш використано однокомпонентний субстрат - тетраметилбензидин (ТМБ).

Ця тест-система схожа з вищепереліченими аналогами, але, по суті, являє собою нову, в якій як антиген використовують актуальний на цей час штам вірусу ІЛТ "B 59-11", а також більш сучасні інші компоненти реакції (кон'югат, субстрат тощо).

До складу тест-системи входять наступні компоненти:

- позитивний контроль - сироватка крові курей з антитілами до вірусу інфекційного ларинготрахеїту, цільна ліофілізована або рідка 0,2 см³-1 флакон;
- негативний контроль - сироватка крові курей, яка не містить антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту, цільна ліофілізована або рідка 0,2 см³-1 флакон;
- антиген інфекційного ларинготрахеїту планшет, сенсibilізований антигеном вірусу інфекційного ларинготрахеїту "B 59-11" - 2 планшети;
- імунопероксидазний кон'югат - антитіла проти Ig G курей, ліофілізований або рідкий, консервованій гентаміцином в об'ємі 0,5 см³-1 флакон;
- буфер для розведення дослідних і контрольних зразків, імунопероксидазного кон'югату 100 см³-1 флакон;
- субстрат - тетраметилбензидин (ТМБ), 25 см³-1 флакон;
- стоп-реагент, 5 см³-1 флакон.

Приклад 1

Приготування робочих розчинів компонентів реакції.

Розчин № 1. Позитивний контроль. Ліофільний вміст флакона з позитивним контролем розчиняли у 0,2 см³ буферу для розведення. Готували перед використанням.

Розчин № 2. Негативний контроль. Ліофільний вміст флакона з негативним контролем розчиняли у 0,2 см³ буферу для розведення. Готували перед використанням.

Розчин № 3. Імунопероксидазний кон'югат. Для одержання робочого розведення кон'югату 1:200 (вказується для кожної серії) в чистий посуд відбирали 12 см³ буферу для розведення і додавали 0,06 см³ кон'югату та ретельно перемішували. Готували перед використанням. Розчин не зберігали.

UA 147074 U

Приклад 2

Постановка реакції ІФА

Розведення сироваток крові та спеціально підготовлених жовтків яєць. Зразки дослідних та контрольних проб розводили буфером для розведення у співвідношенні 1:400.

5 Для попереднього розведення проб використовували чистий несенсибілізований 96-лунковий планшет

1) у лунки планшета для попереднього розведення вносили по 0,195 см³ буферу для розведення;

2) у лунки A1 та B1 вносили позитивний контроль по 0,005 см³;

10 3) у лунки C1 та D1 вносили негативний контроль по 0,005 см³;

4) у всі вільні лунки вносили по 0,005 см³ дослідних зразків.

Проведення аналізу

1) виймали сенсибілізований планшет із запечатаного пакета;

2) у лунки планшета вносили по 0,09 см³ буферу для розведення;

15 3) у лунки A1 та B1 вносили позитивний контроль з планшета для попереднього розведення по 0,01 см³;

4) у лунки C1 та D1 вносили негативний контроль з планшета для попереднього розведення по 0,01 см³;

20 5) у всі вільні лунки вносили по 0,01 см³ дослідних зразків з планшета для попереднього розведення;

6) планшет обережно струшували і переносили в термостат за температури (37±1)°C на 30 хв.;

7) рідину з лунок планшета видаляли і промивали (автоматично або за допомогою багатоканальної піпетки) дистильованою водою в об'ємі 0,300-0,350 см³ на лунку тричі, після чого позбавлялися зайвої вологоти, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу;

8) у кожну лунку планшета вносили по 0,1 см³ робочого розведення кон'югату (розчин № 3). Витримували впродовж (30±2) хв. у термостаті за температури (37±1)°C;

9) рідину з лунок видаляли і промивали (автоматично або за допомогою багатоканальної піпетки) дистильованою водою в об'ємі 0,300-0,350 см³ на лунку тричі, після чого позбавлялися зайвої вологоти, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу;

30 10) у кожну лунку планшета вносили по 0,1 см субстрату, витримували за кімнатної температури (20-24)°C у темряві протягом 15 хв.;

11) реакцію зупиняли внесенням до кожної лунки по 0,1 см³ стоп-реагенту.

Приклад 3

35 Облік результатів

Облік результатів реакції проводили спектрофотометрично при довжині хвилі 450 нм.

40 Для обліку реакції коректним вважали, якщо розбіжність між середніми значеннями позитивної та негативної контрольних сироваток (PC_x - NC_x) не менш ніж 0,075. Середнє значення негативної контрольної сироватки перевищувало 0,2. Наявність або відсутність антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту визначали за розрахунком відношення середньої оптичної щільності дослідної сироватки (S) до середнього значення оптичної щільності (ОЩ) позитивного контролю (P).

45 Наявність антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту визначали за S/P відношенням при розведенні дослідних зразків сироваток крові та спеціально підготовлених жовтків яєць 1:400.

1. Визначення середнього значення ОЩ негативного контролю (NC_x):

$$\frac{\text{Значення A1ОЩ} + \text{Значення B1ОЩ}}{2} = \text{NC}_x$$

$$\frac{0,100 + 0,120}{2} = 0,110$$

Приклад: (NC_x=0,110).

2. Визначення середнього значення ОЩ позитивного контролю (PC_x):

$$\frac{\text{Значення C1ОЩ} + \text{Значення D1ОЩ}}{2} = \text{PC}_x$$

50

$$\frac{0,720 + 0,690}{2} = 0,755$$

Приклад: (PC_x=0,755).

3 Визначення S/P - відношення:

UA 147074 U

$$\frac{\text{ОЩ дослідної сироватки} - \text{NCx}}{\text{PCx} - \text{NCx}} = \text{S/P}$$

Приклад: значення оптичної щільності = 0,480

$$\frac{0,480 - 0,110}{0,755 - 0,110} = \frac{0,370}{0,645} = 0,574$$

(Значення S/P=0,574).

Кінцеве значення титру визначали за S/P відношенням при розведенні сироватки 1:400.

5 4. Визначення титру:

$$\text{Log}_{10} \text{ Tump} = 1,03(\text{log}_{10} \text{ S/P}) + 3,36.$$

Приклад: S/P відношення 0,574

$$\text{Log}_{10} \text{ Tump} = 1,03(\text{log}_{10} 0,574) + 3,36$$

$$\text{Log}_{10} \text{ Tump} = 1,03(-0,241) + 3,36$$

10 $\text{log}_{10} \text{ Tump} = 3,660$

$$\text{Tump} = 10^{3,660} = 4571$$

титр в ІФА	результат
до 799 включно	негативний
від 800 і більше	позитивний

Приклад 4

15 Визначення специфічності, чутливості та відтворюваності тест-системи

Дослідження проводили з використанням виробничої панелі позитивних (n=20) та негативних (n=10) сироваток крові курей до вірусу інфекційного ларинготрахеїту.

20 При постановці реакції з 20 позитивними сироватками нашої внутрішньовиробничої панелі 20 прореагували позитивно, з 10 негативних сироваток нашої внутрішньовиробничої панелі 10 прореагували негативно.

Таким чином, специфічність та чутливість тест-системи при використанні виробничої панелі сироваток становили 100 %.

Відтворюваність, що визначалась за відсотком розбігу від середнього значення оптичної густини зразків однієї сироватки в 20 повторях, склала 14,7 % для негативної сироватки.

25 Таким чином, тест-систему доцільно використовувати для серологічної діагностики інфекційного ларинготрахеїту у курей в лабораторіях ветеринарної медицини.

Таблиця 1

Тест-система для визначення антитіл до вірусу
інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом

№ сироватки	Тест-система (ННЦ "ІЕКВМ")		"BioCheck ILT ELISA"	
	Титр	Результат	Титр	Результат
1	2432	+	8391	+
2	2878	+	6368	+
3	2464	+	5756	+
4	2536	+	5134	+
5	2832	+	4902	+
6	2451	+	3339	+
7	2040	+	3723	+
8	2628	+	6412	+
9	2432	+	3146	+
10	2226	+	3910	+
11	3161	+	3508	+
12	1595	+	2379	+
13	1643	+	4167	+
14	3267	+	3401	+
15	1809	+	3805	+
16	2868	+	3385	+
17	2010	+	6104	+
18	2448	+	7715	+

UA 147074 U

Продовження таблиці 1

19	1653	+	3011	+
20	2049	+	4421	+
21	210	—	39	—
22	0	—	57	—
23	247	—	59	—
24	152	—	635	—
25	219	—	149	—
26	308	—	183	—
27	146	—	277	—
28	0	—	12	—
29	0	—	440	—
30	107	—	46	—

Примітка:

"+" - сироватка позитивна щодо ІЛТ;

"-" - сироватка негативна щодо ІЛТ.

Таблиця 2

Тест-система для визначення антитіл до вірусу
інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом

№ п/п	Оптична густина зразків сироватки	Відтворюваність, %	Примітка
1	0,199; 0,183; 0,172; 0,124; 0,209; 0,190; 0,245; 0,167; 0,155; 0,199; 0,211; 0,234; 0,173; 0,199; 0,160; 0,218; 0,190; 0,178; 0,187; 0,185	14,7	негативна сироватка

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Тест-система для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом, що містить антиген вірусу ІЛТ, позитивну контрольну сироватку крові курей з антитілами до вірусу інфекційного ларинготрахеїту, негативну контрольну сироватку крові курей, імунопероксидазний кон'югат проти Іg курей, буфер для розведення дослідних і контрольних зразків імунопероксидазного кон'югату, субстрат, стоп-реагент, яка відрізняється
- 10 тим, що як антиген містить штам "В 59-11", а як субстратно-індикаторну суміш використано однокомпонентний субстрат - тетраметилбензидин (ТМБ).

Комп'ютерна верстка М. Мацело

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

ДОДАТОК Г

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

проректор з наукової та інноваційної діяльності,
 доктор сільськогосподарських наук
 Дніпровського державного аграрно-
 економічного університету
 професор Юрій КОЛІЧ

« 04 »

березня

2025 р.



А К Т

про впровадження/використання ~~результатів~~
 дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи за темою «Епізоотологічний моніторинг, біологічні властивості ізолятів вірусу та удосконалення серологічної діагностики інфекційного ларинготрахеїту», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 Ветеринарна медицина, виконаної Верецуном Андрієм Леонідовичем впроваджено у робочу програму при викладанні навчальних дисциплін: «Епізоотологія та інфекційні хвороби тварин», «Ветеринарна мікробіологія», «Ветеринарна вірусологія», «Ветеринарна імунологія». Результати епізоотологічного моніторингу та вивчення поширення вірусу інфекційного ларинготрахеїту курей у промислових та присадибних птахівничих господарствах Північно-Східного регіону України, біологічні властивості збудників, виділених від хворих та загинувших курей із диференціацією походження вірусів від вакцинних або польових, а також удосконалення лабораторної серологічної діагностики інфекційного ларинготрахеїту в Україні шляхом використання розробленої тест-системи «Набір компонентів для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом» на кафедрі інфекційних хвороб тварин у підготовці здобувачів вищої освіти ступеня «Магістр» за спеціальністю «Ветеринарна медицина» у Дніпровському державному аграрно-економічному університеті.

Декан факультету

Завідувач кафедри

Іван БІБЕН

Володимир ЗАЖАРСЬКИЙ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор з науково-педагогічної,
наукової роботи,
Полтавського державного аграрного
університету
Анатолій ШОСТЯ
« 1 » жовтня 2025 р

«Затверджую»
 проректор з науково-педагогічної та
 методичної роботи Одеського
 державного аграрного університету
 Ірина Малейко
 «___» _____ 2025 р.

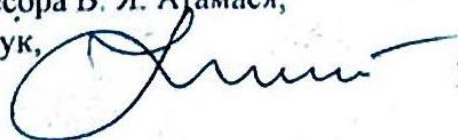


А К Т про впровадження/використання результатів дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи за темою: «Епізоотологічний моніторинг, біологічні властивості ізолятів вірусу та удосконалення серологічної діагностики інфекційного ларинготрахеїту», що представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 Ветеринарна медицина, виконаної Верещуном Андрієм Леонідовичем, впроваджено у робочу програму при викладанні ОК «Епідеміологія та інфекційні хвороби тварин» у підготовці здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина» та використовуються у наукових дослідженнях кафедри інфекційної патології, біобезпеки та ветеринарно-санітарного інспектування ім. професора В. Я. Атамася Одеського державного аграрного університету.

Розглянуто та схвалено на засіданні кафедри інфекційної патології, біобезпеки та ветеринарно-санітарного інспектування ім. професора В. Я. Атамася Одеського державного аграрного університету (протокол № 13 від 22.04.2025 р.).

Завідувач кафедри інфекційної патології,
 біобезпеки та ветеринарно-санітарного
 інспектування ім. професора В. Я. Атамася,
 доктор ветеринарних наук,
 професор



Ігор ПАНІКАР

В.о. декана факультету ветеринарної
 медицини, кандидат ветеринарних
 наук, доцент



Катерина РОДІОНОВА

ДОДАТОК Д

ЗАТВЕРДЖУЮ:

Директор Національного
наукового центру «Інститут
експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини», доктор
ветеринарних наук, професор

 Анатолій ПАЛІЙ
« 26 » _____ 2024 р.

ВИСНОВОК БІОЕТИЧНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ, ЩО ВИКОНУВАЛИСЬ

АНДРІЄМ ЛЕОНІДОВИЧЕМ ВЕРЕЦУНОМ

ЗА ТЕМОЮ «ЕПІЗООТОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ, БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ
ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ ТА УДОСКОНАЛЕННЯ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ
ІНФЕКЦІЙНОГО ЛАРИНГОТРАХЕЇТУ»

Комісія з біоетики Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» в складі Голови, заступника директора з наукової роботи, к. вет. н. Боровкова С.Б., та членів комісії: вченого секретаря ННЦ «ІЕКВМ» к. біол. н. Коваленко Л. В.; в. о. зав. лабораторії менеджменту якості наукових досліджень та наукового маркетингу, к. вет. н. Герілович І. О.; к. вет. н., зав. лабораторії вивчення хвороб свиней Кольчик О. В.; к. вет. н., п.н.с. лабораторії вірусних хвороб птиці Ткаченка С. В.; (склад затверджено Наказом директора ННЦ «ІЕКВМ» від 05.09.2023 р., № 14-з) на своєму засіданні 26.11.2024 р., протокол № 5-24, вивчили матеріали експериментальних досліджень, проведених здобувачем Верецуном А.Л. за виконання дисертаційної роботи «Епізootологічний моніторинг, біологічні властивості ізолятів вірусу та удосконалення серологічної діагностики інфекційного ларинготрахеїту». За результатами роботи комісії зроблено висновок.

Висновок комісії: Установлено, що під час проведення експериментальних досліджень з виконання дисертаційної роботи А.Л. Верецуном за темою «Епізootологічний моніторинг, біологічні властивості ізолятів вірусу та удосконалення серологічної діагностики інфекційного ларинготрахеїту» було дотримано основні принципи біоетики. Кількість тварин у групах за експериментальних досліджень була мінімально необхідною з

урахуванням адекватності щодо мети дослідження. Усі дослідження ґрунтувались на принципах моральних цінностей людини, гуманного поводження з піддослідними тваринами, їх захисту від болю та страждань. Досліди проведені з дотриманням всіх біоетичних вимог відповідно до Статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (ETS №123, 1986) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Голова комісії:

Заступник директора з наукової роботи,
кандидат ветеринарних наук



Сергій БОРОВКОВ

ДОДАТОК Е

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

*Статті у наукових фахових виданнях, що індексуються
у наукометричних базах Scopus і/або Web of Science*

1. **Veretsun, A.**, Stegnyy, B., Usova, L., Rula, O., & Muzyka, D. (2021). The experimental infection of vaccine-like isolates of Infectious laryngotracheitis virus isolated in Ukraine in 2010–2012. *Veterinarija ir Zootechnika*, 79(2), 25–31. <https://vetzoo.lsmuni.lt/data/vols/2021/7902/pdf/veretsun.pdf>. (Дисертантом проведено вірусологічні дослідження та аналіз отриманих даних).

2. **Veretsun, A.**, Stegnyy, B., Rula, O., Bolotin, V., Stegnyy, A., Gerilovych, A., & Muzyka, D. (2021). Molecular and genetic characterization of Avian laryngotracheitis virus isolates obtained in Ukraine. *Agricultural Science and Practice*, 8(1), 37–46. <https://doi.org/10.15407/agrisp8.01.032>. (Дисертант провів аналіз отриманих даних).

Статті у наукових фахових виданнях України категорії «Б»

3. Музика, Д. В., **Верецун, А. Л.**, Стегній, А. Б., Рула, О. М., & Усова, Л. П. (2018). Виділення та ідентифікація епізоотичного ізоляту вірусу інфекційного ларинготрахеїту. *Ветеринарна медицина*, 104, 137–142. https://jvm.kharkov.ua/sbornik/104/VetMed_104.pdf. (Дисертант провів аналіз епізоотичної ситуації щодо ІЛТ в Україні та дослідження з ізоляції збудника).

4. **Верецун, А. Л.**, Рула, О. М., Усова, Л. П., & Музика, Д. В. (2021). Циркуляція вірусу інфекційного ларинготрахеїту у птахівничих господарствах України у 2009–2020 роках. *Ветеринарна біотехнологія*, 38, 21–35. https://doi.org/10.31073/vet_biotech38-02. (Дисертант провів збір

біологічного матеріалу, вірусологічні дослідження та аналіз отриманих даних).

5. **Верещун, А. Л., & Усова, Л. П.** (2021). Очистка та концентрування антигену для ІФА з використанням епізоотичних ізолятів вірусу інфекційного ларинготрахеїту, виділених в Україні. *Ветеринарна медицина*, 107, 65–70. <https://doi.org/10.36016/VM-2021-107-11>. (Дисертант здійснив первинну підготовку вірусотримуючої рідини для виготовлення антигену).

Праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

Матеріали наукових доповідей

6. Usova, L., **Veretsun, A.**, & Muzyka, D. (2019). Infectious laryngotracheitis in Ukraine in 2010–2018: Epizootological monitoring and study of biological properties of field isolates. 4th Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium (Kyiv, Ukraine, 20–24 May 2019): abstracts (p. 239). (Дисертант приймав участь у проведенні досліджень, аналізі результатів, підготовці тез до друку, підготовці постеру, а також презентував ці результати на симпозіумі).

7. **Верещун, А.**, & Музика, Д. (2021). Серологічний моніторинг інфекційного ларинготрахеїту в Україні. *Матеріали III щорічної міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні епідемічні виклики в концепції «Єдине здоров'я», м. Тернопіль, 18–19 травня 2021 року* (с. 16). <http://ivm.kiev.ua/wp-content/uploads/ПРОГРАМА-повна-2021.pdf>. (Дисертант приймав участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку).

8. **Верещун, А. Л., Усова, Л. П., & Музика, Д. В.** (2024). Вітчизняна тест-система для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом. *Тези доповідей онлайн-конференції аспірантів і молодих вчених у сфері Єдиного здоров'я та біотехнології «VetBioConnect», м. Харків, 3–4 червня 2024 року* (с. 51–53). https://www.iekvm.kharkov.ua/documents/VetBioConnect_2024_theses.pdf.

(Дисертант приймав участь у проведенні досліджень, аналізі результатів та підготовці тез до друку).

Праці, які додатково відображають наукові результати дисертації

Патент України на корисну модель

9. Усова, Л. П., Музика, Д. В., Стегній, Б. Т., **Верецун, А. Л.,** & Рула, О. М. (2021). *Тест-система для визначення антитіл до вірусу інфекційного ларинготрахеїту імуноферментним методом* (Патент на корисну модель UA 147074). Національний орган інтелектуальної власності Державне підприємство «Український інститут інтелектуальної власності». <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1587091>. *(Дисертант провів дослідження з розробки та перевірки якості тест-системи).*

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертаційної роботи доповідалися, обговорювалися та були схвалені на: звітних сесіях вченої ради ННЦ «ІЕКВМ» (2018–2024 рр., усні доповіді); регіональному науковому симпозіумі в рамках концепції «Єдине здоров'я» за підтримки ПЗСБД (Програми залучення до спільної біологічної діяльності) 4th Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium (м. Київ, 2019 р., постерна доповідь); III щорічній міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні епідемічні виклики в концепції «Єдине здоров'я» (м. Тернопіль, 2021 р., постерна доповідь); онлайн-конференції аспірантів і молодих вчених у сфері Єдиного здоров'я та біотехнології «VetBioConnect» (м. Харків, 2024 р., постерна доповідь).