

СРАВНЕНИЕ РЕАКТОГЕННОГО И ИММУНОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ЖИВЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА ПТИЦ

С. А. Похвальный¹, М. С. Кукушкина², В. Ю. Кулаков³, Н. В. Мороз⁴, Н. А. Перевозчикова⁵

¹ Научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: pohvalniy@arriah.ru

² Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kukushkina@arriah.ru

³ Ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: kulakov@arriah.ru

⁴ Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: moroz@arriah.ru

⁵ Профессор, доктор биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», e-mail: perevozchikova@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Изучали гуморальный ответ и двигательную активность реснитчатого эпителия слизистой оболочки трахеи у птиц, привитых против инфекционного ларинготрахеита, с помощью цилиостатического теста. Вакцины, вне зависимости от способа применения, снижали двигательную активность слизистой оболочки трахеи птиц на 5–9% с 3-х по 7-е сут после прививки. При этом окулярное применение вакцин у незначительного количества цыплят вызывало развитие односторонних серозных конъюнктивитов с благоприятным исходом. Оральная вакцинация не вызывала каких-либо клинических изменений у птиц. При серологическом мониторинге был выявлен более ранний и напряженный иммунный ответ у птиц, привитых окулярным способом. Требуемый уровень серопротекции в опытных группах превысил минимальное значение (80%) начиная с 16-х сут после вакцинации. При оральном применении срок формирования иммунного ответа зависел от величины иммунизирующей дозы вакцинного препарата. При этом вакцина отечественного производства по безвредности и иммуногенному действию не уступала импортным аналогам.

Ключевые слова: инфекционный ларинготрахеит птиц, реактогенность, цилиостатический тест, сероконверсия.

ВВЕДЕНИЕ

Возбудителем инфекционного ларинготрахеита птиц (ИЛТ) является высококонтагиозный вирус вида *Gallid herpesvirus 1*. ИЛТ – острая респираторная болезнь кур, наносящая значимый экономический ущерб промышленному птицеводству во всем мире [4, 10]. Как правило, с целью борьбы и профилактики ИЛТ используют живые вакцины. При этом вакцинные штаммы обладают способностью к горизонтальной передаче и реверсии при пассировании *in vivo* [4, 6, 8, 11].

Возбудители таких респираторных болезней птиц, как инфекционный бронхит кур, ньюкаслская болезнь, метапневмовирусная инфекция, респираторный микоплазмоз, а также ИЛТ, вызывают остановку скоординированных биений ресничек слизистой оболочки трахеи. В результате накапливается воспалительный экссудат, что приводит к закупорке просвета гортани и трахеи и гибели птицы от удушья. Повышению летальности способствует насаивание секундарной микрофлоры или нахождение птицы в неблагоприятных зоогигиенических условиях (например, наличие сквозняка, высокой запыленности или загазованности воздуха в птичниках) [2, 3, 5, 7, 9], поэтому показатель

летальности не может являться объективной оценкой высокой вирулентности полевого вируса.

В связи с этим цилиостатический тест, заключающийся в балльном оценивании степени остановки мерцательной активности слизистой оболочки трахеи птиц, является более корректной оценкой по сравнению с показателем летальности птицы в инфицированной группе. Данный метод особенно ценен при сравнительной оценке остаточной реактогенности аттенуированных производственных штаммов вируса ИЛТ и исследовании безвредности вакцинных препаратов, поскольку используемые штаммы *a priori* не вызывают гибели птицы [2].

В результате многократных опытов по контрольному заражению цыплят патогенным штаммом «Богатцевский» вируса ИЛТ было установлено наличие связи между напряженностью гуморального иммунитета и протективным действием вакцины. Был обоснован уровень сывороточных антител, гарантирующий защищенность вакцинированных птиц, значение которого двукратно (или более) превосходит минимальное значение позитивно-негативного порога в используемом

Таблица
Основные характеристики трех живых вакцин против ИЛТ

Характеристика	Эмбрион-вакцина из штамма «О»	Нобилис ИЛТ	Галливак LT
Штамм	«О»	«Serva»	«T-20»
Предприятие-изготовитель	ВНИИЗЖ, Россия	Intervet International B.V., Нидерланды	Merial, Франция
Вирусный материал	Гомогенат ткани ХАО и ЭЭЖ эмбрионов СПФ-кур	Гомогенат ткани ХАО и ЭЭЖ эмбрионов СПФ-кур	ЭЭЖ эмбрионов СПФ-кур
Способ применения	Окулярно и орально	Окулярно	Окулярно и орально
Доза вируса в одной прививной дозе вакцины, ЭИД ₅₀	500 (окулярно) 2000 (орально)	320	500

СПФ – категория животных, в организме которых отсутствуют определенные патогенные микроорганизмы и антитела к ним;

ХАО – хорионлантоисная оболочка эмбрионов кур;

ЭИД₅₀ – 50% эмбриональная инфицирующая доза;

ЭЭЖ – экстраэмбриональная жидкость эмбрионов кур.

диагностическом наборе иммуноферментного анализа (ИФА) [1].

Целью настоящих исследований явилось сравнение реактогенного и иммуногенного действия трех живых вакцин против ИЛТ, зарегистрированных на территории РФ, посредством цилиостатического теста, клинического наблюдения и серологического мониторинга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Живые вакцины против ИЛТ. В работе были использованы коммерчески доступные вакцинные препараты, основные характеристики которых представлены в таблице.

Подопытная птица. В опыте использовали 180 цыплят 35-суточного возраста кросса «Хайсекс браун». Эксперимент проводили на базе вивария ФГБУ «ВНИИЗЖ» в боксовом помещении. Птиц соответственно сформированным группам содержали в отдельных перчаточных изоляторах с контролем температуры и давления профильтрованного воздуха и автономной подачей воды и корма.

Цилиостатический тест. Получение трахеальных эксплантатов и оценка их цилиарной активности были проведены согласно методам, описанным ранее [2, 3], с некоторыми изменениями. Кратко: трахеальные поперечные срезы (кольца) из верхнего, среднего и нижнего участков трахеи толщиной 0,5–1,0 мм в количестве 3, 4 и 3 штук соответственно от каждой птицы были исследованы под световым микроскопом инвертированного типа с 60–150-кратным увеличением. Величину показателя остановки двигательной активности каждого трахеального эксплантата оценивали по пятибалльной шкале от 0 до 4. При этом 0 баллов означало отсутствие биения ресничек протяженностью не более 5% периметра окружности эксплантата, 1 балл – не более 25%, 2 балла – не более 50%, 3 балла – не более 75%, 4 балла – отсутствие движения ресничек до 100% периметра окружности. Затем рассчитывали сумму баллов (Σ) цилиостаза эпителия слизистой оболочки 10 трахеальных колец, отобранных от каждого цыпленка. Полученную

величину суммы в баллах (от 0 до 40) переводили в проценты по формуле

$$C, \% = 2,5 \times \Sigma c.$$

Исследование сывороток крови. В сыворотках крови цыплят определяли титры антител к вирусу ИЛТ с помощью твердофазного метода ИФА, используя наборы ProFLOCK LT ELISA Kit (Zoetis, США), значения титров указаны в размерности десятичных логарифмов (lg). Величина позитивно-негативного порога для данной тест-системы составляет 340 (2,531 lg).

Схема опыта. Были сформированы 6 групп цыплят по 30 голов. Группы 1 и 2 были привиты окулярно и орально эмбрион-вакциной против ИЛТ из штамма «О», группы 3 и 4 – окулярно и орально вакциной производства Merial, группа 5 – окулярно вакциной производства Intervet International B.V. согласно инструкциям по применению. Цыплята группы 6 служили в качестве контроля. За птицами на протяжении 28 сут после вакцинации вели ежедневное клиническое наблюдение.

Для проведения цилиостатического теста из каждой группы отбирали по два цыпленка в случайном порядке на 1–7, 9 и 12-е сут после вакцинации. Также для исследования сыворотки в ИФА на наличие антител к вирусу ИЛТ были получены образцы крови до и после вакцинации на 7, 16, 19, 24 и 28-е сут. В каждой группе цыплят определяли выраженную в процентах долю птиц с положительными пробами сывороток с защитной концентрацией антител (уровень серопротекции).

Статистическая обработка результатов. Использовали стандартные методы статистической обработки выборок варьирующих переменных. В тексте представлены средние значения титров сывороточных антител и их стандартные отклонения ($\bar{x} \pm s$), установленные по результатам не менее 10 выборочных измерений ($n = 10$). Вычислительные операции и построение диаграмм выполняли с помощью приложения Microsoft Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клиническое наблюдение за птицей после окулярной и оральной прививки. У незначительного числа цыплят (10–15%) подопытных групп, привитых окулярно тремя вакцинами, на 5–7-е сут наблюдали развитие окулярной реакции в виде одностороннего серозного конъюнктивита (рис. 1). При этом признаки поствакцинальной реакции полностью исчезли к 8–9-м сут после прививки.

У цыплят, привитых орально вакцинами ВНИИЗЖ и Merial, отсутствовала поствакцинальная реакция. На протяжении всего периода наблюдения каких-либо других клинических признаков отмечено не было.

Оценка влияния вакцинации на цилиарную активность трахеи. После прививки у цыплят наблюдали в динамике двигательную активность ресничек слизистой оболочки трахеи (C, %).

Приведенные на диаграмме результаты (рис. 2) иллюстрируют, что изученные вакцины мало различались между собой по времени наступления, силе и продолжительности цилиостатического воздействия независимо от способа введения. Наибольшее цилиостатическое воздействие наблюдали на 3–7-е сут (5–9% цилиостаза). Во всех опытных группах цилиарная активность полностью восстанавливалась к 9–12-м сут после прививки.



Рис. 1. Характерная окулярная реакция на 6-е сут после окулярной прививки (справа) по сравнению с непораженным глазом (слева)

Fig. 1. Typically occurring eye reaction on Day 6 post ocular vaccination (right) compared to a healthy eye (left)

Серологический мониторинг иммунного статуса вакцинированной птицы. Оценивали гуморальный ответ до и на 7, 16, 19, 24, 28-е сут после вакцинации. По первичным данным по каждой группе был вычислен уровень серопротекции (доля иммунных птиц в группе, у которых образовались специфические антитела в ответ на иммунизацию в защитной концентрации).

Результаты исследований (рис. 3) позволяют считать, что изученные вакцинные препараты обладают достаточно высокой иммуногенностью, так как обеспечивают уровень серопротекции выше 80%. Так, в подопытных группах, привитых вакциной ВНИИЗЖ окулярно и орально, количество птиц с защитным титром антител уже на 16-е сут достигло 82 и 92% соответственно. Вакцина Intervet, примененная окулярно, обеспечила 100% защиты на 19-е сут исследования. Напряженный гуморальный иммунный ответ на окулярную прививку вакцины против ИЛТ производства Merial достиг 89% на 16-е сут. При этом защитный уровень антител у цыплят после оральной прививки вакцины Merial сформировался на неделю позже.

ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях интенсивного выращивания и высокой плотности содержания птиц циркулирующие полевые вирусы ослабляют резистентность поголовья и открывают ворота для секундарной условно-патогенной микрофлоры бактериальной природы.

Патогенное действие вируса ИЛТ выражается в репродукции в реснитчатом эпителии слизистой оболочки трахеи, в результате чего пораженные клетки перестают выполнять функцию очистки вдыхаемого воздуха от посторонних частиц. В норме благодаря скоординированному биению ресничек эпителия трахеи частицы в составе слизи перемещаются в сторону гортани и глотки и проглатываются со слюной в пищевод. На данном этапе инфекционный процесс имеет благоприятный исход, если не усугубляется высокой запыленностью или загазованностью воздуха и наслоением бактериальной микрофлоры [3, 5, 7, 9].

В последние 20 лет в США, Австралии и других странах ИЛТ считается эмерджентной проблемой для бройлеров, поскольку до этого вспышки умеренных форм ИЛТ наблюдали исключительно у птицепоголовья яичного направления. Необходимость специфической профилактики ИЛТ в бройлерных хозяйствах отсутствовала [4, 8, 10]. При этом необходимо учесть,

что оральный способ вакцинации бройлеров наиболее удобен по сравнению с окулярным.

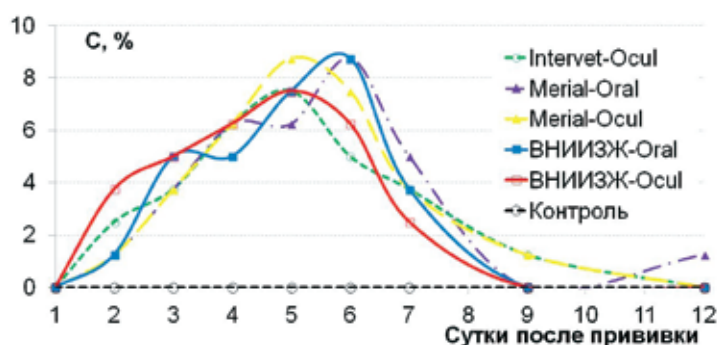
Ранее была показана роль одичавшего вакцинного вируса ИЛТ эмбрионального происхождения в ряде произошедших вспышек болезни у бройлеров. Клиническое проявление ИЛТ характеризовалось развитием конъюнктивита, дыхательной недостаточностью, повышенной смертностью и снижением яйценоскости [4, 8, 10]. Проведенное сравнение культуральной и эмбриональной вакцин против ИЛТ выявило такой недостаток эмбрионального штамма, как способность к реверсии на 20-м пассаже *in vivo* [6]. Однако строгое соблюдение ветеринарно-санитарного режима на птицефабрике и правильное проведение вакцинации предотвращают передачу вакцинного вируса от привитого поголовья к восприимчивому.

При клиническом наблюдении было установлено в качестве поствакцинальной реакции наличие одностороннего серозного конъюнктивита у 10–15% цыплят только в тех группах, которые были привиты окулярно.

По результатам цилиостатического теста была выявлена остановка биений ресничек эпителия площадью 5–9%, что является достаточно умеренным влиянием вакцинных штаммов вне зависимости от способа применения вакцин. При этом полевые изоляты различной степени вирулентности, как правило, вызывают цилиостаз на всей поверхности слизистой оболочки трахеи [2, 3, 5, 7, 9].

При анализе результатов серологического мониторинга была установлена достаточно высокая иммуногенность изученных вакцин. Используемый уровень серопротекции, в отличие от сероконверсии,

Рис. 2. Оценка в динамике цилиостаза, вызванного вакцинами разных производителей в зависимости от способа введения



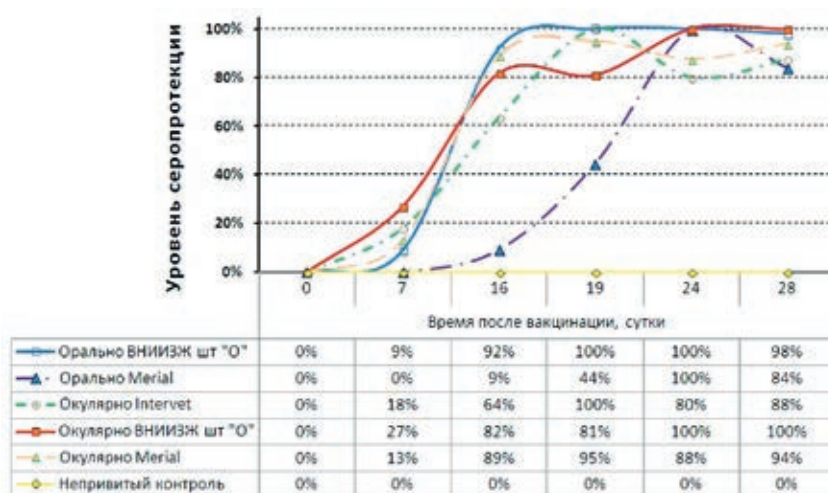


Рис. 3. Серологический мониторинг после оральной и окулярной прививки разными вакцинами

предъявляет более жесткие требования к вакцинам, поскольку выражает долю птиц в привитой группе, у которых после прививки образовались специфические антитела к вакцинному антигену в защитной концентрации. Для эмбрион-вакцины против ИЛТ из штамма «О» (ВНИИЗЖ) в качестве защитной концентрации антител принято двукратное превышение величины позитивно-негативного порога набора твердофазного метода ИФА, которое составляет значение 680 (2,832 Ig) [1].

Таким образом, уровень серопротекции в опытных группах превысил минимальное значение (80%) с 16-х сут после вакцинации. Однако в группе птиц, привитых вакциной Merial орально, была отмечена задержка иммунного ответа на неделю. Связано это, скорее всего, с тем, что и для окулярного, и для орального применения прививная доза вакцины составляет одинаковую величину – 500 ЭИД₅₀.

Непосредственным местом репродукции вируса являются респираторный тракт и конъюнктив [11, 12], а при проглатывании вакцины с питьевой водой значительная часть вируса попадает в пищевод и не вызывает формирования иммунитета. Лишь незначительная часть вакцинного вируса, осевшая на верхнее небо ротовой полости, оказывает после репродукции иммуногенное действие. Таким образом, следует предположить, что задержка иммунного ответа при оральном применении вакцины Merial вызвана низкой прививной дозой вируса.

Для сравнения, одна прививная окулярная доза вакцины ВНИИЗЖ содержит не менее 500 ЭИД₅₀ штамма «О», а пероральная доза в 4 раза выше окулярной и составляет не менее 2000 ЭИД₅₀, что обеспечивает быстрое наступление напряженного иммунитета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что зарегистрированные на территории РФ живые вакцины являются безвредными и иммуногенными. При этом препарат отечественного производства по динамике развития и напряженности гуморального ответа не уступает импортным аналогам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Исследование возможности использования результатов серологических реакций для опосредованной оценки

напряженности иммунитета против инфекционного ларинготрахеита птиц / А. В. Бочарников, В. Ю. Кулаков, Т. В. Оковитая, Ю. В. Зуев // Ветеринарная медицина-2004: міжвід. тем. наук. зб. – Харків, 2004. – Вип. 84. – С. 125–128.

2. Похвальный С. А., Кулаков В. Ю. Влияние вируса инфекционного ларинготрахеита птиц на цилиарную активность слизистой оболочки трахеи кур // Достижения молодых ученых – в ветеринарную практику: материалы IV Междунар. науч. конф., посвящ. 55-летию аспирантуры ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2016. – С. 45–50.

3. Bagust T. J. Laryngotracheitis (Gallid-1) herpesvirus infection in the chicken. 4. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus // Avian Pathol. – 1986. – Vol. 15, No. 3. – P. 581–595.

4. Dufour-Zavala L. Epizootiology of infectious laryngotracheitis and presentation of an industry control program // Avian Dis. – 2008. – Vol. 52, No. 1. – P. 1–7.

5. Guy J. S., Barnes H. J., Morgan L. M. Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: Comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates // Avian Dis. – 1990. – Vol. 34, No. 1. – P. 106–113.

6. Guy J. S., Barnes H. J., Smith L. Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage // Avian Dis. – 1991. – Vol. 35, No. 2. – P. 348–355.

7. Infection of broilers with two virulent strains of infectious laryngotracheitis virus: Criteria for evaluation of experimental infections / A. Vagnozzi, S. M. Riblet, S. M. Williams [et al.] // Avian Dis. – 2015. – Vol. 59, No. 3. – P. 394–399.

8. Molecular epidemiology of infectious laryngotracheitis: A review / K. R. Menendez, M. García, S. Spatz, N. L. Tablante // Avian Pathol. – 2014. – Vol. 43, No. 2. – P. 108–117.

9. Pathological changes of tracheal mucosa in chickens infected with infectious laryngotracheitis virus / S. Hayashi, Y. Odagiri, T. Kotani, [et al.] // Avian Dis. – 1985. – Vol. 29, No. 4. – P. 943–950.

10. Relationship between mortality, clinical signs and tracheal pathology in infectious laryngotracheitis / N. C. Kirkpatrick, A. Mahmoudian, C. A. Colson [et al.] // Avian Pathol. – 2006. – Vol. 35, No. 6. – P. 449–453.

11. Replication and transmission of live attenuated infectious laryngotracheitis virus (ILT) vaccines / A. Rodríguez-Avila, I. Oldoni, S. Riblet, M. García // Avian Dis. – 2007. – Vol. 51, No. 4. – P. 905–911.

12. Replication characteristics of infectious laryngotracheitis virus in the respiratory and conjunctival mucosa / V. R. A. P. Reddy, L. Steukers, Y. Li [et al.] // Avian Pathol. – 2014. – Vol. 43, No. 5. – P. 450–457.

COMPARISON OF REACTOGENICITY AND IMMUNOGENICITY OF LIVE VACCINES AGAINST INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS

S. A. Pokhvalny¹, M. S. Kukushkina², V. Yu. Kulakov³, N. V. Moroz⁴, N. A. Perevozchikova⁵

¹ Researcher, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: pohvalniy@arriah.ru

² Senior Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: kukushkina@arriah.ru

³ Leading Researcher, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: kulakov@arriah.ru

⁴ Head of Laboratory, Candidate of Sciences (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: moroz@arriah.ru

⁵ Doctor of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: perevozchikova@arriah.ru

SUMMARY

Humoral immune response and ciliary activity of tracheal mucosa of poultry, vaccinated against infectious laryngotracheitis using ciliostatic test, was studied. Regardless of the vaccination route the vaccines decreased the ciliary activity by 5–9 % on Days 3 to 7 post vaccination. Herewith the vaccine ocular application in some chicks induced one-eye serous conjunctivitis, which resolved subsequently. Oral vaccination did not cause any clinical changes. Serological monitoring revealed an earlier and stronger immunity in poultry vaccinated by ocular route. The required seroprotection level in test groups was higher than the minimal value (80%) starting from Day 16 post vaccination. The period of immunity development after oral vaccination correlated with the vaccine dose volume. Moreover the domestic vaccine was highly competitive with foreign vaccines in immunogenicity and reactogenicity.

Key words: infectious laryngotracheitis, reactogenicity, ciliostatic test, seroconversion.

INTRODUCTION

Infectious laryngotracheitis (ILT) is caused by a highly contagious virus of *Gallid herpesvirus* 1 type. ILT is a severe respiratory disease of chickens causing significant economic losses in industrial poultry production all over the world [4, 10]. As a rule, live vaccines are used to control and prevent ILT. Herewith the vaccine strains are able to transmit horizontally and reverse when passaged *in vivo* [4, 6, 8, 11].

The agents of such avian respiratory diseases as infectious bronchitis, Newcastle disease, metapneumovirus infection, respiratory mycoplasmosis and ILT affect regular beatings of cilia on tracheal mucosa. As a result an inflammatory exudate accumulates and blocks the lumen of a larynx and trachea, leading to death from choking. Secondary microflora or management of poultry under unfavourable animal health conditions (like draughts, heavy dust burden or gas contamination of the air in poultry houses) contribute to a higher lethality [2, 3, 5, 7, 9]. That's why the lethality rate cannot be judged as an objective criterion of a field virus high virulence.

In this context the ciliostatic test, involving scoring of ciliary beat frequency on avian tracheal mucosa, is a more adequate evaluation, compared to lethality rate in the infected group. This technique is especially valuable when comparing residual reactogenicity of attenuated ILTV production strains and testing safety of vaccines, because the used strains do not kill poultry *a priori* [2].

Multiple challenge tests when chicks were challenged with ILTV Bogatishchevsky pathogenic strain demonstrated that there is a correlation between humoral immunity strength and vaccine protectivity. The level of sera antibodies ensuring protection of vaccinated poultry was justified; its value was twice bigger (or more) than the minimal value of positive/negative threshold used in the ELISA test-kit [1].

This study was aimed at the comparison of reactogenicity and immunogenicity of three live vaccines against ILT, authorized in the RF using the ciliostatic test, clinical observations and serological monitoring.

MATERIALS AND METHODS

Live vaccine against ILT. Commercially available vaccines were used in this study; their basic characteristics are shown in the table below.

Test poultry. 180 35 day-old chicks of Hisex Brown cross were used for the study. The trial was performed in the aseptic room of the FGBI "ARRIAH" animal facilities. Birds were divided into groups and placed into glove boxes with temperature and filtered air pressure controllers and autonomous feed and water supply.

Ciliostatic test. Preparation of tracheal explants and assessment of their ciliary activity were performed according to the methods described before [2, 3], but slightly amended. Briefly: 3, 4 and 3 0.5–1.0 mm tracheal cross sections (rings) from upper, middle and lower parts from every bird were examined under inverted microscope using 60–150× magnification. Immobility value for each tracheal explant was scored using five point system from 0 to 4 point meant absence of ciliary beating in the area of not more than 5% of the section perimeter; 1 point – not more than 25%; 2 points – not more than 50%; 3 points not more than 75% and 4 points meant absence of ciliary movements up to 100% of the section perimeter. Then the sum of points given for epithelial ciliostasis of 10 tracheal rings from each chick was calculated (Σc). The calculated sum of points (from 0 to 40) was transformed into percentage using the following formula:

$$C, \% = 2,5 \times \Sigma c.$$

Sera testing. ILTV antibody titers were determined in chicken sera in solid-phase ELISA using ProfLOCK LT ELISA Kits ("Zoetis", USA), titers were expressed as logs (lg). The value of positive/negative threshold for the above-mentioned test kit is 340 (2.531 lg).

Table
Basic characteristics of three live vaccines against ILT

Criterion	Embryo vaccine based on O strain	Nobilis ILT	Gallivac LT
Strain	O	Serva	T-20
Manufacturer	ARRIAH, Russia	Intervet International B.V., Netherlands	Merial, France
Viral material	Tissue homogenate, CAM and EEF of SPF chicken embryos	Tissue homogenate, CAM and EEF of SPF chicken embryos	EEF of SPF chicken embryos
Application route	Ocular and oral	Ocular	Ocular and oral
Virus dose in one vaccine inoculation dose, EID ₅₀	500 (ocular) 2000 (oral)	320	500

SPF – category of animals free from specific pathogenic factors and antibodies against them;
CAM – chorioallantoic membrane of chicken embryos;
EID₅₀ – 50% embryo infecting dose; EEF – extra embryonic fluid of chicken embryos.

Study design. 6 groups of chicks (30 birds per group) were formed. Groups 1 and 2 were vaccinated ocularly and orally using embryo vaccine against ILT based on strain O, Groups 3 and 4 were immunized ocularly and orally with Merial vaccine, Group 5 was vaccinated ocularly with Intervet International B.V. vaccine according manufacturer's instructions. Birds were clinically observed every day for 28 days post vaccination.

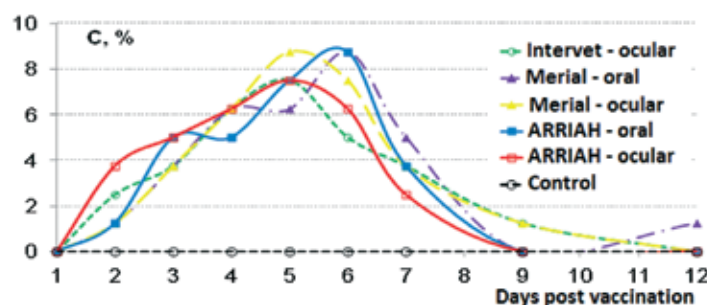
To perform a ciliostatic test two chicks were randomly taken from each group on Days 1–7, 9 and 12 post vaccination. To test sera in ELISA for ILTV antibodies, blood samples were taken before vaccination and on Days 7, 16, 19, 24 and 28 post vaccination. Percentage of birds having sera with protective antibody levels was calculated (seroprotection level).

Statistical processing of results. Standard methods of statistical processing of variable sampling rates were used. The paper presents mean titres of sera antibodies and their standard deviations ($\bar{x} \pm s$), determined by at least 10 sample measured values ($n = 10$). Calculations and diagrams were made using Microsoft Office Excel.

STUDY RESULTS

Clinical observation of birds after ocular and oral vaccination. Some test chicks (10–15%), vaccinated ocularly by three vaccines, demonstrated ocular reactions expressed as one-eye serous conjunctivitis on Days 5–7 (Fig. 1, P. 21). These postvaccinal reactions resolved completely on Days 8–9 post vaccination.

Fig. 2. Assessment of ciliostasis dynamics caused by vaccines of different producers depending on application route



Chicks immunized orally by ARRIAH and Merial vaccines did not demonstrate any postvaccinal reactions. During the whole observation period no other clinical signs were noted.

Evaluation of vaccination effect on ciliary activity in trachea. After vaccination chicks were studied for ciliary activity on tracheal mucosa (C, %).

Results given in the diagram (Fig. 2) show that vaccines under study are little different from each other in onset time, strength and length of ciliostatic effect regardless of application route. The greatest ciliostatic effect was observed on Day 3–7 (5–9% of ciliostasis). Ciliary activity was completely restored up to Day 9–12 post vaccination.

Serological monitoring of vaccinated birds. Humoral response before vaccination and on Days 7, 16, 19, 24, 28 post vaccination were assessed. Based on primary data, seroprotection level was calculated for each group (percentage of immune birds per group which developed specific antibodies in response to vaccination in protective concentration).

Test results (Fig. 3) allow judging that vaccines under study are highly immunogenic because they ensure seroprotection level of more than 80%. In test groups vaccinated with ARRIAH vaccines ocularly and orally the number of birds with protective antibody titres was 82 and 99% on Day 16, correspondingly. Intervet vaccine, applied ocularly, ensured 100% protection on Day 19. A strong humoral immune response to ocular vaccination against ILT using Merial vaccine was 89% on Day 16. Herewith the protective antibody level in chicks after oral vaccination using Merial vaccine developed a week later.

DISCUSSION

Under conditions of intensive management and high flock density circulating field viruses attenuate the population resistance and open the gates for secondary opportunistic pathogenic bacterial microflora.

ILTV pathogenic effect consists of reproduction in tracheal cilia which stop purifying inhaled air from extraneous matter. Normally, thanks to coordinated ciliary beating on tracheal mucosa, the particles with mucus are moved towards larynx and throat and are swallowed together with saliva into esophagus. At this stage the infectious process is likely to be completely resolved, if it is not complicated with high dustiness, gas contamination and bacterial microflora [3, 5, 7, 9].

During the past 20 years in the USA, Australia and other countries ILT has been considered an emergent problem in broiler flocks, because previously the outbreaks of moderate ILT were reported exclusively in egg-laying flocks. There was no need in specific ILT prevention on broiler farms [4, 8, 10]. Herewith it is necessary to take into account that oral vaccination of broilers is more convenient when compared to an ocular one.

Previously the role of a "feral" vaccine ILT virus of embryonic origin was demonstrated in several outbreaks, occurred in broilers. ILT clinical manifestation was characterized by conjunctivitis, respiratory failure, high mortality and egg drop [4, 8, 10]. Comparison of cultural and embryo vaccines against ILT revealed a deficiency of an embryo strain, i.e. reversibility at passage 20 *in vivo* [6]. But a strict compliance with biosecurity rules on a poultry farm prevent transmission of a vaccine virus from vaccinated flocks to susceptible ones.

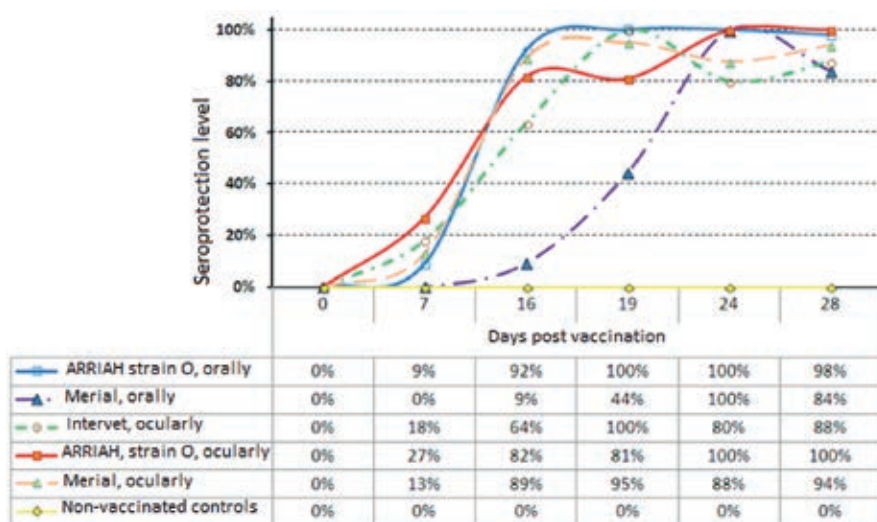


Fig. 3. Serological monitoring after oral and ocular vaccination by different vaccines

One eye serous conjunctivitis in 10–15% chicks in ocularly vaccinated groups was noted as a postvaccinal reaction during clinical observation.

Based on the results of the ciliostatic test, the cease in ciliary beating in 5–9% of epithelial area was identified, which is considered to be a moderate effect of vaccine strains regardless of the vaccination route. At the same time, as a rule, field isolates of different virulence cause ciliostasis in the whole surface of the tracheal mucosa [2, 3, 5, 7, 9].

When analyzing serological monitoring results, a sufficiently high immunogenicity of vaccines under study was established. The used seroprotection level, as opposed to seroconversion, imposes stricter requirements to vaccines, as it expresses the percentage of birds in vaccinated groups which developed protective levels of specific antibodies to a vaccine antigen. For ILT embryo vaccine, based on strain O (ARRIAH), a double value of positive-negative threshold of ELISA test-kit equal to 680 (2.832 lg) was taken [1].

Thus seroprotection level in test groups exceeded the minimal value (80%) on Day 16 post vaccination. But immunity level in poultry vaccinated with Merial vaccine, showed a week delay in immunity development. This is likely associated with the fact that the vaccination dose both for ocular and oral vaccination is the same: 500 EID₅₀.

The virus reproduction sites are a respiratory tract and a conjunctiva [11, 12]; when swallowing the vaccine with drinking water the significant part of the virus gets to an esophagus and does not induce the immunity. Only small part of the virus, which settled down on the palate of the mouth cavity is immunogenic after reproduction. Thus it suggests that immunity development is delayed due to a low inoculation dose, when the poultry is immunized orally.

For reference one inoculation ocular ARRIAH strain O vaccine dose contains at least 500 EID₅₀, and the oral dose is 4 times bigger than the ocular one, at least 2,000 EID₅₀; which ensures rapid development of a strong immunity.

CONCLUSION

The results of the study suggest that live vaccines authorized in the RF are safe and immunogenic. Herewith the domestic vaccine is highly competitive with the imported analogues in humoral response development dynamics and strength.

REFERENCES

- Studying possibilities of serological tests results use for assessment of immunity strength against infectious laryngotracheitis / A. V. Bocharnikov, V.Yu. Kulakov, T. V. Okovyta, Yu. V. Zuyev // Ветеринарна медицина-2004: міжвід. тем. наук. зб. – Харків, 2004. – Вип. 84. – p. 125–128.
- Pokhvalny S. A., Kulakov V. Yu. Infectious laryngotracheitis virus effect on ciliary activity of avian tracheal mucosa // Achievements of young scientists to veterinary practice: proceedings of the IV International Scientific Conference devoted to 55 Anniversary of FGBI "ARRIAH" Post-Graduate Training. – Vladimir, 2016. – P. 45–50.
- Bagust T. J. Laryngotracheitis (Gallid-1) herpesvirus infection in the chicken 4. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus // Avian Pathol. – 1986. – Vol. 15, No. 3. – P. 581–595.
- Dufour-Zavala L. Epizootiology of infectious laryngotracheitis and presentation of an industry control program // Avian Dis. – 2008. – Vol. 52, No. 1. – P. 1–7.
- Guy J. S., Barnes H. J., Morgan L. M. Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: Comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates // Avian Dis. – 1990. – Vol. 34, No. 1. – P. 106–113.
- Guy J. S., Barnes H. J., Smith L. Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage // Avian Dis. – 1991. – Vol. 35, No. 2. – P. 348–355.
- Infection of broilers with two virulent strains of infectious laryngotracheitis virus: Criteria for evaluation of experimental infections / A. Vagnozzi, S. M. Riblet, S. M. Williams [et al.] // Avian Dis. – 2015. – Vol. 59, No. 3. – P. 394–399.
- Molecular epidemiology of infectious laryngotracheitis: A review / K. R. Menendez, M. García, S. Spatz, N. L. Tablante // Avian Pathol. – 2014. – Vol. 43, No. 2. – P. 108–117.
- Pathological changes of tracheal mucosa in chickens infected with infectious laryngotracheitis virus / S. Hayashi, Y. Odagiri, T. Kotani, [et al.] // Avian Dis. – 1985. – Vol. 29, No. 4. – P. 943–950.
- Relationship between mortality, clinical signs and tracheal pathology in infectious laryngotracheitis / N. C. Kirkpatrick, A. Mahmoudian, C. A. Colson [et al.] // Avian Pathol. – 2006. – Vol. 35, No. 6. – P. 449–453.
- Replication and transmission of live attenuated infectious laryngotracheitis virus (ILT) vaccines / A. Rodríguez-Avila, I. Oldoni, S. Riblet, M. García // Avian Dis. – 2007. – Vol. 51, No. 4. – P. 905–911.
- Replication characteristics of infectious laryngotracheitis virus in the respiratory and conjunctival mucosa / V. R. A. P. Reddy, L. Steukers, Y. Li [et al.] // Avian Pathol. – 2014. – Vol. 43, No. 5. – P. 450–457.