

<https://doi.org/10.30766/2072-9081.2025.26.1.174-183>



УДК 619:616.98:578.832.1:615.371:616-097.3

Профилактика гриппа птиц H5N1: инактивированная вакцина на основе антигена низкопатогенного варианта вируса против высокопатогенного штамма

© 2025. Н. В. Мороз, Д. А. Долгов, И. А. Чвала, С. В. Фролов ,
А. Д. Грехнева, В. Ю. Кулаков

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир,
Российская Федерация

Высокопатогенный грипп птиц – это острая проблема для птицеводства всего мира. Вирусы высокопатогенного гриппа являются причиной разрушительных эпизоотий, приносящих значительные экономические потери. Кроме этого, высокая вероятность реассортации вирусного генома может привести к скачкообразному расширению спектра патогенности возбудителя, который будет опасен для человека. На этом основании разработка эффективных средств специфической профилактики гриппа птиц является актуальной. Оценка защищающей способности (протективного эффекта) инактивированной вакцины против гриппа птиц (ГП) «АвиФлуВак» на основе антигена низкопатогенного вируса ГП H5N1 штамма «Ямал». Испытание в остром опыте против выделенного на территории России в 2023 г высокопатогенного вируса ГП птиц штамма A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1. Вакцина «АвиФлуВак», параллельно с которой в качестве референта была использована экспериментальная вакцина на основе антигена высокопатогенного вируса ГП H5N1. Обе вакцины были испытаны с разными дозами (D) соответствующих антигенов. В постоянном прививном объеме содержались следующие дозы: неразведенный антиген ($D = 1$); 1/25; 1/50; 1/100. Каждой дозой была привита отдельная группа из n-числа птиц. Через 28 суток после иммунизации в группах определили средние логарифмические титры антител ($T, \log_2$) к вирусу ГП и провели заражение высокопатогенным вирусом. В каждой группе ежедневно регистрировали долю клинически больных и погибших особей (с). Через 10 суток определяли групповые клинические показатели ($C = \Sigma c/n$) и протективные индексы ($PI = 1 - C$). Значения PI преобразовывали в линейные эквиваленты вида $f = \log(PI/(1 - PI))$. Для изучаемого и референтного препаратов строили регрессионные модели $f = k(\lg D) + f_0$, по которым рассчитали относительную концентрацию антигена, необходимую для защиты 50 % вакцинированных птиц (PD_{50}). Установили, что прививной объем вакцины «АвиФлуВак» содержал $(1,982 \pm 0,088) \lg PD_{50}$, или $\approx 96 PD_{50}$, аналогичный показатель для референтной вакцины составил $(1,581 \pm 0,122) \lg PD_{50}$, или $\approx 38 PD_{50}$. Установленные величины имели существенные различия ($p \leq 0,01$). Исследование связи между показателями f и T позволило определить, что ожидаемые титры антител, которые соответствовали защите 95 % вакцинированных птиц, для вакцины «АвиФлуВак» и референтного препарата составили статистически равные оценки ($\log_2$) – 5,85 и 6,09 соответственно.

Ключевые слова: высокопатогенный вирус гриппа птиц, инактивированные вакцины, доза антигена в вакцине, протективный эффект вакцины

Благодарность: работа выполнена за счёт средств ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Мороз Н. В., Долгов Д. Л., Чвала И. А., Фролов С. В., Грехнева А. Д., Кулаков В. Ю. Профилактика гриппа птиц H5N1: инактивированная вакцина на основе антигена низкопатогенного варианта вируса против высокопатогенного штамма. Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2025;26(1):174–183.
DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2025.26.1.174-183>

Поступила: 27.08.2024

Принята к публикации: 14.02.2025

Опубликована онлайн: 26.02.2025

The prevention of H5N1 avian influenza: inactivated low pathogenicity avian influenza virus-based vaccine against high pathogenicity avian influenza virus strain

© 2025. Natalya V. Moroz, Dmitry L. Dolgov, Ilya A. Chvala, Sergey V. Frolov , Alyona D. Grekhneva, Vladimir Yu. Kulakov

Federal Centre for Animal Health (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russian Federation

High pathogenicity avian influenza remains a great challenge for poultry farming industry worldwide. High pathogenicity avian influenza viruses cause devastating epizootics leading to significant economic losses. Moreover, high viral genome reassortment probability could result in abrupt virus pathogenicity expansion and the virus will become dangerous for humans. Considering this, development of specific vaccines against avian influenza is of great importance. The research was aimed at the evaluation of protective effect of "AviFluVac" inactivated vaccine against avian influenza based on H5N1 low pathogenicity AIV Yamal strain antigen. The vaccine was tested for its protective effect by challenge using H5N1 highly pathogenicity AI virus A/gull/Kirov/998-1/2023 strain isolated in Russia in 2023. "AviFluVac" vaccine used in parallel with the pilot vaccine based on H5N1 HPAI virus antigen as a reference vaccine. Both vaccines were tested at different concentrations (D) of relevant antigens. Constant vaccine inoculation volume contained undiluted antigen (D = 1); 1/25; 1/50; 1/100. Vaccine containing each antigen concentration was inoculated to a separate group of chickens (n). Mean logarithmic antibody titres (T, log₂) to avian influenza virus were determined in the groups 28 days after vaccination and then chickens were challenged with high pathogenicity avian influenza virus. Proportions of clinically diseased and dead chickens (c) were registered daily in each group. Group clinical scores (C = $\Sigma c/n$) and protective index values (PI = 1 - C) were determined 10 days after challenge. PI values were converted into linear equivalents: $f = \log(PI/(1 - PI))$. Regression models, $f = k(\lg D) + f_0$, were constructed for tested and reference vaccines and used for calculation of relative antigen concentration required for protection of 50 % of vaccinated chickens (PD₅₀). It was shown that "AviFluVac" inoculation volume contained (1.982±0.088) lgPD₅₀, or ≈ 96 PD₅₀ and reference vaccine inoculation volume contained (1.581±0.122) lgPD₅₀, or ≈ 38 PD₅₀. The calculated values were significantly different (p≤0.01). The study of the relationship between f and T values revealed that the expected antibody titers corresponding to the 95 % protection of vaccinated chickens, were statistically equal (log₂) for the AviFluVac vaccine and reference vaccine – 5.85 and 6.09 respectively.

Keywords: high pathogenicity avian influenza, inactivated vaccines, antigen concentration in the vaccine, vaccine protective effect

Acknowledgements: the study was funded by the FGBI "Federal Centre for Animal Health" as a part of research activities ("Veterinary Welfare").

The authors express their gratitude to the reviewers for their contribution to the peer review of this paper.

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Для цитирования: Moroz N. V., Dolgov D. L., Chvala I. A., Frolov S. V., Grekhneva A. D., Kulakov V. Yu. The prevention of H5 avian influenza: inactivated low pathogenicity avian influenza virus-based vaccine against high pathogenicity avian influenza virus strain. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka* = Agricultural Science Euro-North-East. 2025;26(1):174–183. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2025.26.1.174-183>

Received: 27.08.2024

Accepted for publication: 14.02.2025

Published online: 26.02.2025

В настоящее время высокопатогенный грипп птиц (ВПГП) – это актуальная проблема для птицеводства всего мира. Вирусы ВПГП (H5N1) являются причиной разрушительных эпизоотий, приносящих значительные экономические потери. Например, в 2022 г. в результате распространения ВПГП (H5N1) во Франции к марту было уничтожено 11 млн птиц,

в США к сентябрю 2022 г. потери превысили 20 млн голов^{1, 2}. О вспышках ВПГП (H5N1) в 2022 г. сообщили всего 67 стран на пяти континентах, что привело к потере более 131 млн голов домашней птицы³. В период апрель-июнь 2023 г. вспышки вируса ВПГП (H5N1) были зарегистрированы в 25 странах Европы у домашних и диких птиц – 98 и 634 эпизода соответственно⁴.

¹Маилян Э. С. Грипп птиц. Новый взгляд на прошлое, настоящее и будущее птицеводства. НПК Фарминдустрия. [Электронный ресурс]. URL: <https://pharminindustria.com/projects/poleznye-stati-po-veterinari/gripp-ptits-novyy-vzglyad-na-proshloe-nastoyashchee-ptizevodstva/> (дата обращения: 03.07.2024).

²Службы инспекции здоровья животных и растений Министерства сельского хозяйства США (USDA) (APHIS). [Электронный ресурс]. URL: <https://www.cdc.gov/flu/avianflu/poultry.htm> (дата обращения: 03.07.2024).

³Ongoing avian influenza outbreaks in animals pose risk to humans. Situation analysis and advice to countries from FAO, WHO, WOAH. 12 July 2023 Statement/Geneva/Paris/Rome. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.fao.org/animal-health/news-events/news/detail/ongoing-avian-influenza-outbreaks-in-animals-pose-risk-to-humans/en> (дата обращения: 03.07.2024)

⁴Avian influenza overview April–June 2023. EFSA Journal. 2023;21(7):8191.

URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/avian-influenza-overview-april-june-2023>

В РФ по данным Россельхознадзора, на 17.10.2023 г. вспышки ВПГП (H5N1) зарегистрированы: в 57 населенных пунктах (н. п.) у дикой птицы; в 6 н. п. – на птицефабриках; в 8 н. п. у домашней птицы⁵. Отмечено, что в этом году болезнь поражала нетипичные виды диких птиц, а именно, чаяк. Например, очагом заболевания в Москве стали Борисовские пруды, где были найдены погибшие чайки, из останков которых выделен геном вируса ВПГП подтипа H5N1⁶. В центральных регионах России неблагополучные птицефабрики во всех случаях находятся в непосредственной близости от н. п., где зафиксированы вспышки ВПГП (H5N1) у диких птиц⁷, что явно указывает на источник распространения вируса.

Наряду с ограничительными мерами, надежным способом борьбы с ВПГП служит специфическая профилактика болезни. Среди антигриппозных вакцин наиболее широкое распространение имеют инактивированные цельновирионные препараты [1, 2]. Протективный эффект таких вакцин зависит от двух связанных составляющих: концентрации антигена в составе препарата и структурного соответствия между антигенами вакцины и полевого агента [2, 3]. При этом, из соображений эпизоотологической опасности, для получения антигенов рекомендуется использовать вирус низкопатогенных вариантов [4]. Примером инактивированного препарата специфической профилактики ВПГП на основе низкопатогенного варианта вируса является вакцина «АвиФлуВак».

Цель исследований – оценка эффективности инактивированной вакцины «АвиФлуВак» против эпизоотически актуального для России в 2023 г. вируса ВПГП H5N1.

В рамках указанной цели были поставлены следующие задачи:

- определение филогенетической принадлежности изолята вируса ВПГП, выделенного во время вспышки заболевания на территории РФ, который будет использован для испытания протективного эффекта вакцины;
- оценка количества 50%-ных протективных доз, содержащихся в прививном объеме вакцины;

- определение величины среднего титра поствакцинальных антител, обеспечивающих защиту 95 % вакцинированных птиц.

Научная новизна – проведение иммунологических исследований вакцины «АвиФлуВак» в отношении актуального, эпизоотически опасного для птицы высокопатогенного вируса гриппа птиц подтипа H5.

Материал и методы. Объект исследования – вакцина против гриппа птиц (H5), инактивированная эмульсионная «АвиФлуВак». Активный компонент – антиген НППГ подтипа H5N1 (штамм «Ямал») в составе экстраэмбриональной жидкости (ЭЭЖ) инфицированных эмбрионов кур. В качестве контроля объекта исследования использовали экспериментальную инактивированную эмульсионную вакцину против гриппа птиц H5 на основе антигена ВПГП подтипа H5N1 (референтная вакцина). Активный компонент – антиген ВПГП подтипа H5N1 (штамм №125-ДЕП «Новосибирский») относится к кладе 2.2 в составе экстраэмбриональной жидкости (ЭЭЖ) инфицированных эмбрионов кур. Вирусы инактивированы аминоктилэтиленимином (0,25 %).

Получение образцов вакцин с заданной концентрацией антигена. Концентрации антигенов (D) в прививном объеме вакцин регулировали путем разведения исходных препаратов соответствующих антигенов физиологическим раствором в соотношении: 1:25, 1:50 и 1:100 (D = 25; D = 50 и D = 100), а также не разведенные антигены (D = 1). Далее полученные препараты антигенов эмульгировали в соотношении 30/70 в масляном адъюванте Montanide ISA 70 VG. Смешивание с разбавителем проводили в лабораторном гомогенизаторе тканей при 6000 оборотах в течение 10 минут. Стабильность эмульсии после смешивания оценивали центрифугированием при 1000 g в течение 10 минут. Значение 1000 g регламентировано стандартом организации (СТО) и достаточно для оценки показателя «стабильность» полученного типа эмульсии. Эмульсию считали стабильной, если отслоение легкой (масляной) фракции не превышало 5 % по объему, а отслоение тяжелой (водной) фракции не происходило.

⁵Вспышки ВПГП на территории РФ в 2023 г. (данные Россельхознадзора). [Электронный ресурс].

URL: <https://fsvps.gov.ru/wp-content/uploads/2023/10/%D0%92%D0%9F%D0%93%D0%9F-%D0%BD%D0%B0-17.10.2023-scaled.jpg> (дата обращения: 03.07.2024).

⁶Грипп птиц Борисовские пруды. Информационный портал Дзен. [Электронный ресурс].

URL: <https://dzen.ru/search?query=грипп%20птиц%20борисовские%20пруды&sid=310585425165382784/> (дата обращения: 26.08.24)

⁷URL: <https://www.fao.org/animal-health/news-events/news/detail/ongoing-avian-influenza-outbreaks-in-animals-pose-risk-to-humans/en>

Птица. Цыплята яичного кросса Ломан Браун в возрасте 4 недель серонегативные к вирусу ГП. Работу с птицей проводили в соответствии с ГОСТ 33215-2014⁸, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU (от 22.09.10)⁹ по охране животных, используемых в научных целях.

Иммунизация птиц. Каждый образец вакцины с заданной концентрацией антигена был испытан на отдельной группе птиц численностью не менее 10 голов. Препарат вводили внутримышечно в область груди в объеме 0,5 см³. Дополнительно образовали группу контроля вируса численностью 10 голов, в которой иммунизацию не проводили (интактные птицы). Группы птиц содержали в изолированных настольных боксах с автономной вентиляцией, подачей воды и корма.

Эмбрионы кур. Развивающиеся 9–11-суточные эмбрионы кур категории СПФ (VALO BioMedia GmbH, Германия).

Выделение вируса гриппа птиц. Использовали патматериал, полученный из эпизоотического очага (пробу внутренних органов погибшей дикой птицы). На фосфатном буфере (рН 7,2–7,4) готовили 10–20 %-ную тканевую суспензию, которую центрифугировали в течение 15 мин при 1000 g. В супернатант добавляли антибиотики (100 Ед/мл бензилпенициллина натриевую соль, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата и 50 Ед/мл нистатина). Полученный материал вводили в аллантоисную полость куриных эмбрионов в объеме 0,2 см³. Инокулированные эмбрионы инкубировали при 37 °C и относительной влажности 60–70 %. Ежедневно проводили овоскопию. Эмбрионы, погибшие после 24 ч инкубации и более, использовали для сбора экстраэмбриональной жидкости. Специфичность гибели подтверждали исследованием ЭЭЖ в реакции гемагглютинации. Положительно реагирующие образцы ЭЭЖ считали вирусным материалом.

Определение титра инфекционного вируса на эмбрионах кур. Использовали метод предельных разведений. Готовили последовательные десятикратные разведения вирусного материала на фосфатном буфере (рН 7,2–7,4).

Каждое разведение тестировали на группе эмбрионов ($n \geq 5$). Материал инокулировали в аллантоисную полость в объеме 0,2 см³. Положительной реакцией (присутствие вируса) считали гибель эмбриона, установленную после более чем 24-х часов инкубации. Расчет величины титра проводили по Керберу и выражали в ЭИД₅₀/см³.

ОТ-ПЦР. Суммарную РНК выделяли, используя набор RNeasy Mini Kit (Qiagen, кат. №74106), в соответствии с инструкцией производителя. ОТ-ПЦР проводили в одну стадию с помощью набора OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, кат. № 210212) с соответствующими системами праймеров для выявления генома вируса гриппа птиц и идентификации подтипа H5N1.

Секвенирование генома вируса. Нуклеотидные последовательности фрагментов генов определяли с применением автоматического секвенатора ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США). Анализ и сравнение нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили, используя пакет прикладных программ BioEdit, версия 7.0.5.3. Также для сравнительного анализа использовали ранее опубликованные [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/>] в международной базе GenBank последовательности изолятов и штаммов вируса гриппа птиц А/Н5. Построение и редактирование филогенетического дерева осуществляли с помощью алгоритма NJ в реализации пакета MEGA, версия 7.

Реакция гемагглютинации (РГА). Пробы антигенсодержащих материалов исследовали в РГА в соответствии с методикой, изложенной в Руководстве ВОЗЖ для наземных животных для вакцин и диагностикумов [4]. Определяли титр гемагглютинирующих единиц (ГАЕ).

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Пробы сывороток крови птиц исследовали в РТГА согласно методике, изложенной в Руководстве ВОЗЖ для наземных животных для вакцин и диагностикумов [4]. Определяли величину титра антител. Положительной считали реакцию, где показатель титра имел оценку 1:16 и более, т. е. $4 \log_2$.

⁸ГОСТ 33215-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур. М.: Стандартинформ, 2016. 19 с.

URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293757/4293757886.pdf?ysclid=m6uqrsfuxj368295094>

⁹Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей. [Электронный ресурс].

URL: <https://base.garant.ru/70350564/?ysclid=m6uqoqheah373369825> (дата обращения: 26.08.2024).

Заражение птиц. В группах иммунизированных и интактных птиц проводили контрольное заражение через 28 суток после вакцинации. Для заражения использовали вирус ВПГП H5N1 штамм A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1 в дозе 6,0 lg ЭИД₅₀. Вирусный материал вводили внутримышечно в область бедра в объеме 0,5 см³. Наблюдения клинического состояния зараженной птицы продолжали в течение 10 суток.

Обработка экспериментальных данных. Использовали общепринятые способы обработки выборок варьирующих переменных (определяли средние значения, стандартные отклонения и стандартные ошибки средних). Применяли элементы регрессионного анализа. Описание специальных статистических методов дано в тексте. Вычислительные операции и графические построения выполняли в приложении Excel.

Результаты и их обсуждение. Выделение вируса, оценка вирулентности и определение филогенетической принадлежности штамма. Установили, что исследуемый биологический материал содержал инфекционный вирус, который был летальным для эмбрионов (специфический падеж составил 23/30). Полученные пробы ЭЭЖ демонстрировали положительную РГА (от 1:64 до 1: 256) и по результатам ОТ-ПЦР содержали высокую концентрацию генома вируса гриппа птиц (средняя оценка Ct = 18).

Сайт расщепления гемагглютинаина выделенного вируса гриппа имел структуру -REKRRKR-, что позволило охарактеризовать его как потенциально высоковирулентный.

Внутривенная инъекция вирусосодержащей ЭЭЖ (10-кратное разведение на фосфатном буфере) в объеме 0,1 см³ 10 цыплятам в возрасте 5 недель (серонегативным к вирусу гриппа птиц) показала, что в течение последующих 10 суток 9 цыплят (90 %) погибли при наличии характерных для ВПГП клинических признаков (диарея, выделение из носа, цианоз неоперенных участков кожи). Специфичность падежа подтверждена ОТ-ПЦР, где в материале показано присутствие генома вируса ВПГП. Полученные результаты соответствовали клиническим критериям проявления ВПГП [4].

При проведении сравнительного генетического анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена НА определили, что вирус A/gull/Kirov/998-1/2023 принадлежит

к азиатской генетической линии вируса ВПГП подтипа H5, клада 2.3.4.4.b, получившего эпизоотическое распространение в предыдущие годы в странах Азии, Европы, Африки, Северной и Южной Америки. Выделенный вирус был определен как штамм вируса гриппа птиц A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1. Положение штамма в структуре филогенетического дерева показано на рисунке 1.

Согласно данным международных баз GenBank и GISAID(EpiFlu), наиболее генетически близкими к A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1 являются вирусы подтипа H5N1, выявленные в 2023 году на территории ряда европейских стран. Исходя из сроков выявления на территории европейских стран (февраль – май 2023 года, по данным базы GISAID (EpiFlu)) идентичные изоляты активно циркулировали уже несколько месяцев – как минимум с начала 2023 года.

Таким образом, учитывая распространение вируса гриппа H5N1 в регионе, а также занос и распространение инфекции в ряде регионов Российской Федерации, в дальнейшей работе использован вирус A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1.

Оценка иммунологических показателей вакцин. Все образцы вакцин, содержащие заданные концентрации антигенов, были испытаны на птицах параллельно. Через 28 суток после вакцинации определяли средние по группам логарифмические титры антител к вирусу ГП, установленные в РТГА (log₂T).

Далее во всех подопытных группах птиц провели заражение штаммом A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1. В течение 10 суток в каждой группе ежедневно определяли текущие оценки клинических показателей ($c = a + b$, где a и b – количество клинически больных и погибших птиц соответственно). По окончании срока наблюдений в группах определяли накопленные клинические показатели ($\sum c/n$, где n – число птиц в группе до заражения) и вычисляли индексы защиты (протективные индексы) вида $PI = 1 - \sum c/n$.

Показатели иммунологического действия исследуемых вакцин, установленные в подопытных группах птиц приведены в таблице.

Исследовали связь (зависимость) между дозой антигена и протективным индексом. Для приближения зависимости параметров D и PI к линейному виду значения D выражали в логарифмах (lg D), а величины PI преобразовывали

в линейные эквиваленты по Берксона¹⁰ вида $f = \lg (PI / (1 - PI))$. Таким образом, 50%-ный протективный эффект вакцины ($PI = 0,5$) соответствовал эквиваленту $f = 0$. Для значений $PI = 1$ использовали условные оценки $PI_i = (1 - 1/5^n)^{11}$.

Для построения наиболее вероятных моделей связи показателей IgD и f применили регрессионный анализ¹². Получили линейные

регрессионные уравнения, имеющие вид: $f = (-1,017)IgD + 2,016$ – для антигена НППП ($R^2 = 0,932$) и $f = (-1,079)IgD + 1,706$ – для антигена ВППП ($R^2 = 0,967$), где f – прогнозируемое значение индекса соответственно заданного IgD . Для графического представления регрессии PI и IgD использовали обратное преобразование f в размерность доли по формуле $PI = 1 - 1 / (1 + (\text{antilg } f))$ (рис. 2).

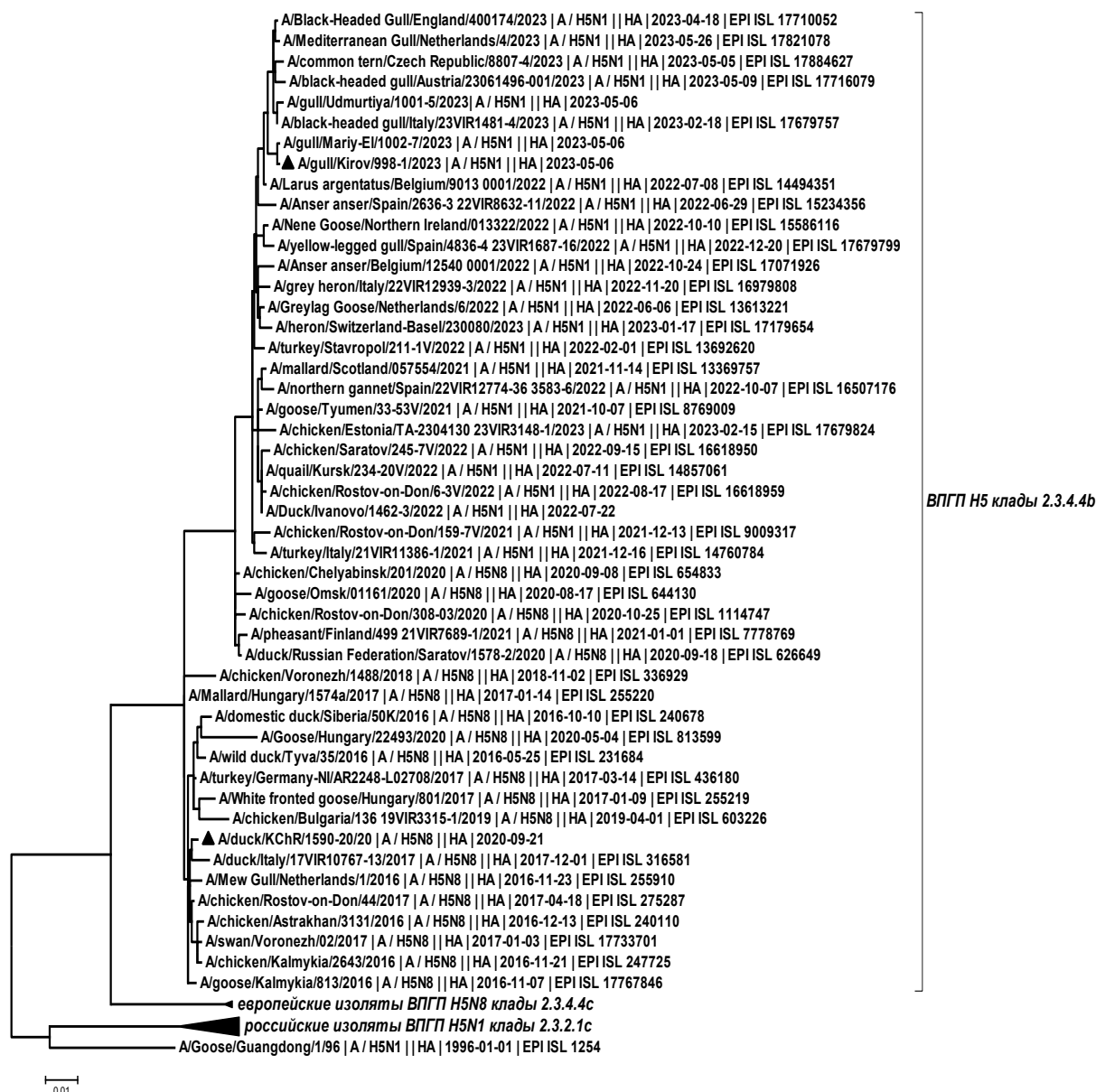


Рис. 1. Филогенетическое дерево ВППП, построенное по полноразмерной последовательности гена HA /
Fig. 1. Phylogenetic tree of HPAI virus constructed based on full-length HA gene sequence

¹⁰Ван дер Ваден Б. Л. Математическая статистика. М.: изд-во иностранной литературы, 1960. 434 с.

URL: <https://libcats.org/book/405713>

¹¹Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. М.: Медицина; 1975. 297 с. URL: <https://reallib.org/reader?file=1213098>

¹²Фёрстер Э., Рёни Б. Методы корреляционного и регрессионного анализа. М.: Финансы и статистика, 1983. 304 с. URL: <https://djvu.online/file/ZebZGmmgEErGN>

Таблица – Показатели иммунологического действия образцов инактивированных вакцин против ГП на основе антигенов НППГ и ВППГ вируса H5N1 /

Table – Indicators of immunological effect of the inactivated anti-AI vaccine specimens based on LPAI antigens and H5N1 HPAI virus

Оценки показателей соответственно испытанным антигенам и дозам / Vaccine immunological effect indicators given in accordance with tested antigens and concentrations				
Антиген / Antigen	доза антигена / antigen concentration	титр в РТГА / HI titre	клинический показатель / clinical score	протективный индекс / protective index
	*D (lg D)	**log ₂ T	***($\sum c$)/n	PI = 1 - ($\sum c$)/n
НППГ / LPAIV	1 (0,00)	6,67	0/17	1,0
	1:25 (1,40)	5,33	1/10	0,9
	1:50 (1,70)	4,33	4/10	0,6
	1:100 (2,00)	2,00	6/10	0,4
ВППГ / HPAIV	1 (0,00)	6,33	0/10	1,0
	1:25 (1,40)	5,00	3/10	0,7
	1:50 (1,70)	2,00	7/10	0,3
	1:100 (2,00)	2,00	7/10	0,3
Контроль / Control		0,47	10/10	0,0

* Величина разведения антигена в прививном объеме; ** средний логарифмический титр антител в группе птиц после вакцинации; *** $\sum c$ – количество клинически больных и погибших птиц после контрольного заражения (накопленный показатель в течение опыта); n – число птиц в группе до заражения /

* Antigen dilution in vaccine inoculation volume; ** mean logarithmic antibody titre in group of chickens after vaccination; *** $\sum c$ – number of clinically diseased and dead chickens after challenge (score accumulated during the test); n – number of chickens in a group before challenge

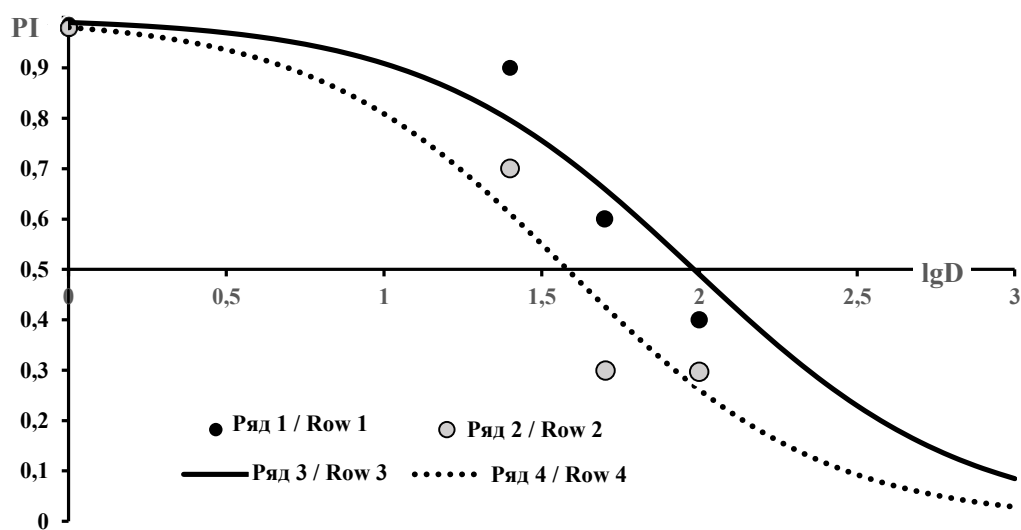


Рис. 2. Зависимость между испытанными дозами (lgD) антигенов НППГ и ВППГ вируса H5N1 и протективными индексами (PI) вакцины «АвиФлуВак» и референтного препарата против вируса ВППГ H5N1. Оси координат: lgD – логарифм величины разведения антигена в составе препарата; PI – индекс защиты (доля вакцинированных птиц, защищенных в остром опыте от клинического проявления гриппа). Горизонтальная ось пересекает вертикальную в точке P = 0,5 (50%-ой защиты). Даны экспериментальные оценки индексов защиты после испытания заданных разведений антигенов НППГ (Ряд 1) и ВППГ (Ряд 3). Показаны: линия регрессии 'P' по lgD, где: 'P' = 1 - 1/(1 + (antilg 'f)); 'f' – прогнозируемый индекс по уравнению 'f' = (-1,017)lgD + 2,016 для антигена НППГ (Ряд 2); то же по уравнению 'f' = (-1,079)lgD + 1,706 для антигена ВППГ (Ряд 4) /

Fig. 2. The relationship between tested concentrations (lgD) of the LPAIV and H5N1 HPAIV antigens and protective indices (PI) of AviFluVac vaccine and reference vaccine against H5N1 HPAI. Coordinate axes: lgD – logarithm of the antigen dilution contained in the vaccine; PI – protective index (proportion of vaccinated birds protected from clinical AI manifestations after challenge). The horizontal axis intersects the vertical one at the point P = 0.5 (50 % protection). Protective indices experimentally estimated after testing of specified LPAIV antigen dilutions (Row 1) and HPAIV antigen dilutions (Row 3) are given. The following is shown: regression line 'P' according to lgD, where: 'P' = 1 - 1/(1 + (antilg 'f)); 'f' – predicted index according to the equation 'f' = (-1.017)lgD + 2.016 for the LPAIV antigen (Row 2); the same according to the equation 'f' = (-1.079)lgD + 1.706 for the HPAIV antigen (Row 4)

Опираясь на принципы, изложенные в книге «Статистическая обработка результатов фармакологических исследований»¹³, по регрессионным уравнениям рассчитали дозы антигенов, обеспечивающих защиту 50 % (PD₅₀) вакцинированных птиц. Установили, что прививной объем неразведенного антигена НППП содержал $2,016/1,017 = (1,982 \pm 0,088) \lg PD_{50}$, аналогичный показатель для препарата ВППП составил $1,706/1,079 = (1,581 \pm 0,122) \lg PD_{50}$. Использовали статистику Стьюдента для числа степеней свободы $f = 30 + 30 - 2 = 58$. Определили, что

по отношению к критериальному показателю неравенство $(1,982 - 1,581) / \sqrt{(0,088^2 + 0,122^2)} = 2,67 \geq t_p = 2,66$ выполняется на уровне $p = 0,01$, т. е. сопоставляемые оценки $\lg PD_{50}$ имеют существенные различия.

Исследование связи протективного эффекта и напряженности поствакцинального гуморального иммунитета. Провели анализ зависимости между величинами $\log_2 T$ и f , установленными для испытанных прививных доз антигенов. Полученные результаты представлены в виде диаграммы (рис. 3).

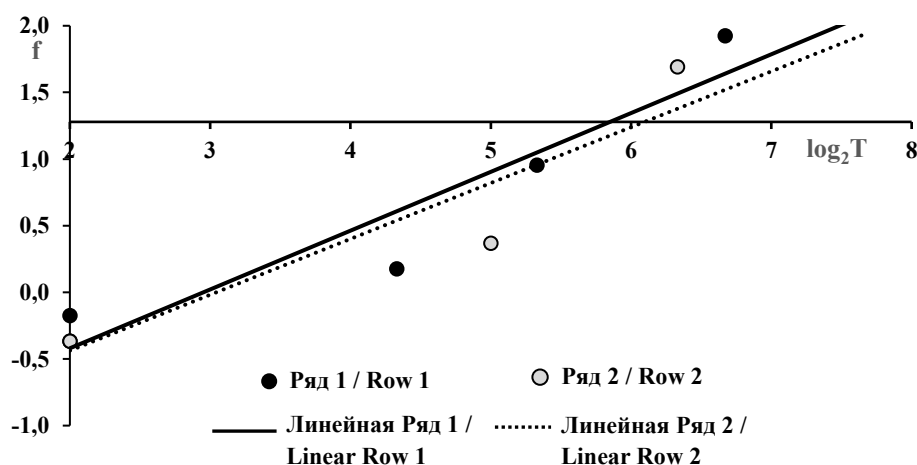


Рис. 3. Зависимость между величиной титра антител к вирусу гриппа ($\log_2 T$) и эквивалентом индекса защиты птиц (f). Оси координат: $\log_2 T$ – логарифм величины титра антител; f – эквивалент индекса защиты, где: $f = \lg(P/(1 - P))$; P – индекс защиты (доля вакцинированных птиц, защищенных в остром опыте от клинического проявления гриппа). Горизонтальная ось пересекает вертикальную в точке $f = 1,279$, соответствующей $P = 0,95$ (95% защиты). Даны экспериментальные оценки индексов защиты после испытания заданных разведений антигенов НППП (Ряд 1) и ВППП (Ряд 2). Показаны: линия регрессии f по $\log_2 T$, где: f – индекс, прогнозируемый по уравнению $f = (0,441)\log_2 T + 1,302$, имеющего оценку адекватности $R^2 = 0,871$ для антигена НППП (Ряд 1); то же по уравнению $f = (0,419)\log_2 T + 1,275$, имеющего оценку адекватности $R^2 = 0,890$ для антигена ВППП (Ряд 2) /

Fig. 3. The relationship between anti-AI antibody titer ($\log_2 T$) and equivalent of chicken protection index (f). Coordinate axes: $\log_2 T$ – logarithm of the antibody titer; f – equivalent of the protection index, where: $f = \lg(P/(1 - P))$; P – protective index (proportion of vaccinated birds protected from AI clinical manifestation after challenge). The horizontal axis intersects the vertical one at the point $f = 1,279$, corresponding to $P = 0,95$ (95% protection). Protection indices experimentally estimated after testing of specified LPAIV antigen (Row 1) and HPAIV antigen (Row 3) dilutions are given. Regression line f according to $\log_2 T$, where: f is the index predicted by the equation $f = (0,441)\log_2 T + 1,302$, having an adequacy score $R^2 = 0,871$ for the LPAIV antigen (Row 1); the same according to the equation $f = (0,419)\log_2 T + 1,275$, having an adequacy score $R^2 = 0,890$ for HPAIV antigen (Row 2)

Из данных рисунка 3 следует, что регрессионные модели, построенные для исследуемых вакцин, имели удовлетворительные коэффициенты адекватности и были практически идентичны. Полученные уравнения позволили определить ожидаемые титры антител (T_{95}),

которые соответствуют 95 % защиты вакцинированных птиц, или индексу $f = 1,279$. Искомые оценки составили для НППП – величину $\log_2 T_{95} = (1,279 + 1,302)/0,441 = 5,853$, или 1:60; для ВППП – величину $\log_2 T_{95} = (1,279 + 1,275)/0,419 = 6,095$, или $T_{95} \approx 68$.

¹³Прозоровский В. Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований. Психофармакология и биологическая наркология. 2007;7(3–4):2090–2120. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=11691694> EDN: JVWCBJ

Известно, что вспышки ВППП на птицеводческих предприятиях (например, в США) в большинстве случаев географически совпадают с путями миграции диких водоплавающих птиц¹⁴. Учитывая роль орнитофауны в распространении инфекции ВППП в ряде регионов РФ, штамм A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1 следует считать эпизоотически опасным. На этом основании использование данного штамма в качестве вируса-пробойника для оценки протективного действия вакцин против ВППП является обоснованным.

Концентрация антигена в прививном объеме инаktivированной вакцины является важнейшей характеристикой препарата. Основной антиген вируса (гемагглютинин) может быть измерен в абсолютных единицах, например, в весовых [1] или в единицах действия, например в PD₅₀. Считается, что прививной объем эффективной вакцины против гриппа птиц должен содержать 50 PD₅₀ [2, 4], что соответствует 0,3–7,8 [2], или 3 мкг гемагглютинина [4].

Процедура проведения острого опыта полностью соответствовала общепринятой методике [4]. Как следует из полученных результатов, вакцина «АвиФлуВак» на основе антигена НППП и использованная в качестве референта вакцина на основе антигена ВППП, обеспечили защиту 100% иммунизированных птиц при введении одного прививного объема, что доказывает их эффективность. Однако результаты регрессионного анализа показали, что (с учетом стандартной ошибки) прививной объем препарата «АвиФлуВак» содержал 96 (78 ÷ 117) PD₅₀, а прививной объем референтного препарата – 38 (29 ÷ 51) PD₅₀. Это означало, что антигенный потенциал вакцины «АвиФлуВак» против штамма A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1 более чем в 2,5 раза превосходил контрольный препарат и в 1,9 раза – рекомендуемую концентрацию [4].

Ранее уже была проведена оценка протективных свойств вакцинного препарата из штамма «Ямал» [5], которая показала эффективную защиту против гетерологичного подтипа H5N8 на примере штамма A/duck/KChR/1590-20/2. Вирус A/duck/KChR/1590-20/2 также принадлежит к генетической кладе 2.3.4.4b. Результаты филогенетического анализа, приведенные в данной работе, свидетельствуют об активном антигенном дрейфе вирусов гриппа птиц подтипа H5 на территории Евразии в период 2016-

2023 гг. Изоляты вируса гриппа птиц, против которых была экспериментально показана эффективная защита вакцинными препаратами на основе штамма «Ямал» отмечены на рисунке 1 черным треугольником.

Поскольку защита птиц от генерализованной инфекции вируса гриппа в основном обеспечивается выработкой антител против вирусного гемагглютинина (HA) [6], то данные РТГА являются важными показателями напряженности поствакцинального гуморального иммунитета. Известны титры иммунных сывороток в РТГА, которые свидетельствуют о защите птиц от заболеваемости и смертности – 4 log₂ [4, 7] и титры, предотвращающие в том числе локальную репродукцию вируса – 6,5 log₂ [7]. При этом необходимо, чтобы титр антител более 4 log₂ присутствовал у 80 % птицепоголовья [8]. При выполнении настоящих исследований защита 95 % вакцинированных птиц соответствовала ожидаемым титрам 5,9 и 6,1 log₂ для вакцины «АвиФлуВак» и контрольного препарата, соответственно. Эти оценки статистически не различимы между собой и удовлетворительно согласуются с вышеприведенными данными.

Заключение. Результаты проведенных исследований позволили сделать следующие выводы:

- выделенный из патологического материала, полученного в очаге заболевания на территории РФ, вирус определен как штамм ВППП A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1, который принадлежит к азиатской генетической линии вируса ВППП подтипа H5, кладе 2.3.4.4b. Штамм охарактеризован как эпизоотически опасный для РФ;

- установлено, что инаktivированная эмульсионная вакцина «АвиФлуВак» обладает протективным эффектом против штамма ВППП A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1 и на 28-е сутки после иммунизации полностью предотвращает клиническое проявление болезни при заражении вакцинированных птиц. Протективный потенциал вакцины составил 96 PD₅₀ в одном прививном объеме;

- показано, что вакцина «АвиФлуВак» на 28-е сутки после применения индуцирует у птиц напряженный гуморальный иммунитет против гриппа. Поствакцинальный титр антител к вирусу гриппа в РТГА, соответствующий защите 95 % привитых птиц, составил прогнозируемую величину 5,9 log₂ (или ≈ 1:60).

¹⁴Маилян Э. С. Грипп птиц. Новый взгляд на прошлое, настоящее и будущее птицеводства. НПК Фарминдустрия. URL: <https://pharmindustria.com/projects/poleznye-stati-po-veterinari/gripp-ptits-novyy-vzglyad-na-proshloe-nastoyashchee-ptizevodstva/>

References

1. Peyre M., Fusheng G., Desvaux S., Roger F. Avian influenza vaccines: a practical review in relation to their application in the field with a focus on the Asian experience. *Epidemiology & Infection*. 2009;137(1);1–21.
DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268808001039>
2. Swayne D. E. Laboratory methods for assessing and licensing influenza vaccines for poultry. In: Spackman E. (eds) *Animal Influenza Virus. Methods in Molecular Biology*. Humana, New York, NY, 2020. Vol. 2123. pp. 211–225.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8_16
3. Lee Y. J., Sung H. W., Choi J. G., Lee E. K., Jeong O. M., Kwon Y. K., et al. Effects of homologous and heterologous neuraminidase vaccines in chickens against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *Avian Diseases*. 2007;51(s1):476–478.
DOI: <https://doi.org/10.1637/7548-033106R.1>
4. Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses). OIE. *Terrestrial Animal Health* 2021. Chapter 3.3.4., pp. 1–24. URL: https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf
5. Фролов С. В., Чвала И. А., Мороз Н. В., Кулаков В. Ю., Сосипаторова В. Ю., Андрейчук Д. Б. Иммунобиологические свойства инактивированных вакцин против высокопатогенного гриппа птиц, изготовленных на основе антигенов штаммов вируса гриппа подтипа А/Н5N1 различной вирулентности. *Ветеринария сегодня*. 2022;11(4):367–374.
DOI: <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-4-367-374> EDN: RAVLZB
6. Frolov S. V., Chvala I. A., Moroz N. V., Kulakov V. Yu., Sosipatorova V. Yu., Andreychuk D. B. Immunobiological properties of inactivated anti-highly pathogenic avian influenza vaccines based on antigens of A/H5N1 avian influenza virus strains of different virulence. *Veterinariya segodnya = Veterinary Science Today*. 2022;11(4):367–374. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-4-367-374>
6. Katz J. M., Lu X., Frace A. M., Morken T., Zaki S. R., Tumpey T. M. Pathogenesis of and immunity to avian influenza A H5 viruses. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2000;54(4):178–187. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(00\)89024-1](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(00)89024-1)
7. Kumar M., Chu H.-J., Rodenberg J., Krauss S., Webster R. G. Association of serologic and protective responses of avian influenza vaccines in chickens. *Avian Diseases* 2007;51(s1):481–483. DOI: <https://doi.org/10.1637/7605-041706R1.1>
8. Джавадов Э. Д., Дмитриева М. Е. Грипп птиц. СПб: ГНУ ВНИВИП Россельхозакадемии, 2011. 187 с.
Dzhavadov E. D., Dmitrieva M. E. Avian flu. Saint-Petersburg: *GNU VNIVIP Rossel'khozakademii*, 2011. 187 p.

Сведения об авторах

Мороз Наталья Владимировна, кандидат вет. наук, зав. лабораторией профилактики болезней птиц, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), мкр. Юрьево, г. Владимир, Владимирская область, Российская Федерация, 600901, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9672-8594>

Долгов Дмитрий Львович, заведующий сектором инактивированных вакцин лабораторией профилактики болезней птиц, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), мкр. Юрьево, г. Владимир, Владимирская область, Российская Федерация, 600901, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6802-9940>

Чвала Илья Александрович, кандидат вет. наук, заместитель директора по НИР, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), мкр. Юрьево, г. Владимир, Владимирская область, Российская Федерация, 600901, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>

✉ **Фролов Сергей Владимирович**, кандидат вет. наук, начальник отдела профилактики болезней птиц, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), мкр. Юрьево, г. Владимир, Владимирская область, Российская Федерация, 600901, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6802-9940>, e-mail: frolov@arriah.ru

Грехнева Алёна Дмитриевна, аспирант референтной лаборатории вирусных болезней птиц, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), мкр. Юрьево, г. Владимир, Владимирская область, Российская Федерация, 600901, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-6119-0202>

Кулаков Владимир Юрьевич, кандидат вет. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики болезней птиц, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), мкр. Юрьево, г. Владимир, Владимирская область, Российская Федерация, 600901, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1898-4576>

Information about the authors

Natalya V. Moroz, PhD in Veterinary, Head of the Laboratory for Avian Disease Prevention, Federal Centre for Animal Health (FGBI «ARRIAH»), mcr. Yur'vetes, Vladimir, Vladimir region, Russian Federation, 600901, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9672-8594>

Dmitry L. Dolgov, PhD in Veterinary, Head of the Unit for Inactivated Vaccines, the Laboratory for Avian Disease Prevention, Federal Centre for Animal Health (FGBI «ARRIAH»), mcr. Yur'vetes, Vladimir, Vladimir region, Russian Federation, 600901, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6802-9940>

Ilya A. Chvala, PhD in Veterinary, Deputy Director for Research, Federal Centre for Animal Health (FGBI «ARRIAH»), mcr. Yur'vetes, Vladimir, Vladimir region, Russian Federation, 600901, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>

✉ **Sergey V. Frolov**, PhD in Veterinary, Head of the Unit for Avian Disease Prevention, the Laboratory for Avian Disease Prevention, Federal Centre for Animal Health (FGBI «ARRIAH»), mcr. Yur'vetes, Vladimir, Vladimir region, Russian Federation, 600901, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6802-9940>, e-mail: frolov@arriah.ru

Alyona D. Grekhneva, Postgraduate, Reference Laboratory for Viral Avian Diseases, Federal Centre for Animal Health (FGBI «ARRIAH»), mcr. Yur'vetes, Vladimir, Vladimir region, Russian Federation, 600901, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-6119-0202>

Vladimir Yu. Kulakov, PhD in Veterinary, leading researcher, the Laboratory for Avian Disease Prevention, Federal Centre for Animal Health (FGBI «ARRIAH»), mcr. Yur'vetes, Vladimir, Vladimir region, Russian Federation, 600901, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1898-4576>

✉ – Для контактов / Corresponding author